

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Sección Departamental de Fisiología (Veterinaria)



TESIS DOCTORAL

**Caracterización y producción de β -NGF y su papel en la
fisiología reproductiva del conejo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana Sánchez Rodríguez

Directores

Rosa María García García
Pedro Luis Lorenzo González

Madrid 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Sección Departamental de Fisiología (Veterinaria)



**CARACTERIZACIÓN Y PRODUCCIÓN DE
 β -NGF Y SU PAPEL EN LA FISIOLÓGÍA
REPRODUCTIVA DEL CONEJO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR:

Ana Sánchez Rodríguez

Bajo la dirección de los doctores:

Rosa María García García

Pedro Luis Lorenzo González

Madrid, 2018

Universidad Complutense De Madrid

FACULTAD DE VETERINARIA

Sección Departamental de Fisiología (Veterinaria)

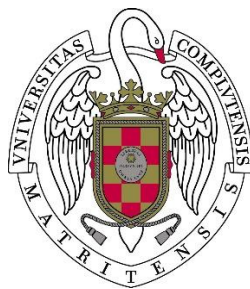


**CARACTERIZACIÓN Y PRODUCCIÓN DE
 β -NGF Y SU PAPEL EN LA FISIOLÓGÍA
REPRODUCTIVA DEL CONEJO**

TESIS DOCTORAL

Ana Sánchez Rodríguez

Madrid, 2018



Los Dres. **Rosa María García García** y **Pedro Luis Lorenzo González**, Profesores Titulares de Universidad de la Sección Departamental de Fisiología (Veterinaria) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, hacen constar:

Que la presente Memoria de Tesis Doctoral titulada: ***“Caracterización y producción de β -NGF y su papel en la fisiología reproductiva del conejo”***, de la cual es autora la Licenciada en Veterinaria **D^a Ana Sánchez Rodríguez**, ha sido realizada bajo su dirección conjunta y que, tras su revisión, consideran que tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

Madrid, 18 Septiembre de 2018

Fdo.: D^a. Rosa María García García

Fdo.: D. Pedro Luis Lorenzo González

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la concesión y disfrute de un Contrato Predoctoral UCM-Santander y al Plan Nacional AGL2015-65572-C2, concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad.

PORTADA ELABORADA POR MARIANA RAMÍREZ

FONDO: IMAGEN DE CÉLULAS PC12 EN PROCESO DE DIFERENCIACIÓN

A mi familia, en especial a mis padres y a mi abuelo Pepe

A Manolo y Mila

A todos los finqueros

“Scientific investigations, pushed on and on, will reveal new ways in which God works, and bring us deeper revelations of the wholly unknown.”

-María Mitchell, primera mujer astrónoma en América

AGRADECIMIENTOS

Después de todo el trabajo “de campo”, de todas las horas de estar pensando en por qué salen los resultados que salen, de tanto tiempo de escribir... De hacer 4 años de tesis, ¡vaya! Me doy cuenta de lo vital que ha sido toda la gente que me ha rodeado en este camino, tanto a nivel profesional como a nivel personal. Realizar la tesis doctoral es un trabajo duro, muchas veces frustrante, ya que intentas una y otra vez que te “salga lo que quieres” y sigue sin salir, al que dedicas mucho tiempo de tu vida y parece que no te recompensa lo suficiente... Y, por eso, todas las personas que te acompañan en el camino son fundamentales para ayudarte a levantarte.

En primer lugar, quiero agradecer a los que forman parte también de esta tesis y han hecho posible que la pueda llevar a cabo: mis directores, Rosa y Pedro.

Rosa, muchísimas gracias por estar siempre al pie del cañón, por estar pendiente “a lo largo de” esta tesis doctoral, por la cantidad de refranes que siempre tenías guardados para cada ocasión (las cosas de palacio van despacio...), porque cuando yo he estado de bajón porque no me iba a dar tiempo, me has animado para seguir, y cuando estaba de subidón por resultados un poco dudosos, me ponías los pies en el suelo... Gracias por darle vueltas a los resultados conmigo y por querer llegar a las explicaciones correctas y no sólo a “lo que parece ser”. Gracias por haber estado siempre disponible y por tener paciencia con mis empecinamientos varios... Gracias por la perseverancia con el p75, ¡qué hubiéramos hecho sin él! Jaja. De verdad, que esta tesis no hubiera sido posible sin que hubieras estado detrás.

Y Pedro, gracias por darme un punto de vista, a nivel profesional, desde una perspectiva mucho mayor que la que yo puedo tener. Gracias porque, aunque creas que no me valen tus explicaciones de “mutaciones génicas”, tus aportaciones son muy enriquecedoras y me hacen darle vueltas al coco al fondo de la fisiología reproductiva. Gracias por tu paciencia al corregirme mis frases en español “inglesado” sin comas ni puntos ni puntos y coma. A ti también te digo, que esta tesis no se podría haber realizado si no hubieras estado detrás.

Gracias también a Pilar porque has estado también detrás de todo el proyecto y has hecho posible que muchos de los experimentos se lleven a cabo; gracias por tu rapidez en corregir papers, ¡me sorprende! Y gracias por todas tus aportaciones, porque realmente aprendo muchísimo. ¡Hemos conseguido que las conejas ovulen! Gracias por tu positividad y por hacer sencillas las mañanas enteras con el pico de LH...

Gracias a los de bioquímica que me han adoptado en su departamento. Gracias Chema porque cada vez que me asomaba a tu despacho y decía “¿te puedo hacer una preguntita?”, tus respuestas siempre eran “claro, por supuesto, pasa”. Gracias por explicarme cada detalle del mundo de la Bioquímica; has conseguido que me fascine y me apasione. Y sobre todo, ¡has conseguido que me entere bien de las cosas! Muchas gracias, Chema.

¡Palomis! Qué te voy a decir... ¡¡Que mil millones de gracias!! Por estar siempre dispuesta a ayudarme... “Paloma... ¿me ayudas un momentito con los cálculos?” Jaja. Gracias por esos ánimos cuando la secuencia no quería salir... Cuando las bandas de PCR eran 5 cuando tenía que ser una... Cuando los WB no salían... Gracias porque te has implicado tanto para ayudarme, ¡que parecía que era tu tesis también! Un pedacito de esta tesis te pertenece, porque sin toda tu sabiduría científica, no hubiera sido posible... ¡Tía, que hemos producido una proteína! Jeje.

Y al resto de las chicas bioquímicas, gracias también. Por crear un ambiente de trabajo tan agradable, que da gusto tirarse horas en el laboratorio. Susi, ¡gracias! Pedazo técnico de laboratorio que eres, siempre pendiente de la gente, enseñando todo lo que sabes, ni una mala cara... ¡Gracias por haberme ayudado tanto! Isa, gracias por estar siempre pendiente de cómo va la tesis y por ser un ejemplo de cómo se puede compaginar el baile con la investigación jeje. Sandra, gracias por esos cafés mañaneros de muy pronto por la mañana... y por ayudarme en todo lo que te pedía... (¡eres la caña!) ¡Los westerns no podrán con nosotras! Laura, ¡cómo me voy a olvidar de ti! Gracias por la sencillez con la que ves las cosas y los ánimos que me has transmitido en esta última época. Y Amalia, Mila y Antonio, gracias por haber contribuido al ambiente tan apacible del departamento.

Gracias también a los de mi pasillo. Gracias a Luis y a Gonzalo, con los que he podido compartir un poco de góspel, y a Rosana y a Alfredo, porque habéis hecho que el día a día sea muy llevadero. Sois una gente excepcional, gracias. Y aunque no esté en el mismo pasillo, pero como si lo estuviera, gracias a María Arias, por tus consejos sobre concentraciones, diluciones, ELISAs... y ¡sobre la vida misma!

Gracias a todos los que, a nivel técnico, me han ayudado, ya sea con aparatos, anticuerpos, reactivos, conejos... Los paseos que me he dado por toda la facultad (y por fuera) han merecido la pena para conocer a gente como Alberto (¡gracias por encenderme el Odyssey antes de bajar!), Nuria (ese espectrofotómetro molón), Bea (gracias por toda la ayuda con las conejas y por enseñarme a sacar sangre de orejas que ya no había ¡ni por donde cogerlas!), May (gracias por enseñarme los secretos del ELISA), Belén (gracias por enseñarme a abrir los “epis” con una sola mano y a ¡cómo utilizar una pipeta!), María José (qué buena bedel de repro tiene el hospital, gracias por ayudarme a cuadrar los calendarios para no coincidir en el CASA), Gustavo (gracias por prestarme vuestros aparatos) y Abel (recuerdo algo de una napolitana... jeje), Pedro del Servicio de Histología del hospital (gracias por enseñarme cómo es eso de parafinar y hacer cortes histológicos), Yosú y toda la gente del INIA (gracias por los “momentos ovarios”), Dani, Belén y Jose del Centro de Impresión (¡sois unos pedazo de profesionales!). Gracias también a Patricia, que me ha ayudado tantísimo con los últimos experimentos de semen y de sangre, y porque me ha enseñado el mundo “sin gluten”. Y también por todo lo que ha tenido que aguantar, gracias Manuela, que seguramente muchos doctorandos hayamos estado en tus pesadillas últimamente... pero gracias por solucionarnos todas las dudas que teníamos. Gracias también a los del equipo de Secretaría de la facultad, en especial a Pedro, que hace posible la parte administrativa de las tesis. También quiero agradecer a Tere, del servicio de limpieza, porque me ha estado animando durante todos los días mientras pasaba la balleta por mi mesa.

Por supuesto, no pueden faltar mis más sinceros agradecimientos para quienes me ayudaron desde el principio a saber cómo “mirar el semen al microscopio”: Cuca y Juan Carlos. Han sido muchos momentos y muy buenos los que hemos pasado y, a pesar de que últimamente no haya podido estar pendiente de cómo van Jaleo, Edecán, Cecos... sigo recordando mi “técnica Nadal”, así que tendré que volver a practicar, no sea que se me olvide... Y M^a Ángeles, gracias también por todo lo que he aprendido contigo y por estar siempre dispuesta a enseñarme. Gracias a todos los internos que habéis formado parte de mi “docencia”; ha sido un placer dedicar el tiempo a enseñar lo poco que puedo saber.

Gracias a mis compañeros de batalla doctoral... Dani, Rubén, Marta y Jorge... Ya dentro de nada todos doctores. Gracias Dani y Marta porque hemos sido como “radio-patio” para

intentar enterarnos de todos los papeles que teníamos que entregar. Gracias Rubén porque no sé qué habría hecho con la estadística si no hubiera podido tener un asesor como tú jaja. Gracias Jorge por todos los momentos hablando de tus placentas y mi proteína y de ti diciéndome “Ana, tienes que publicar ya”. Gracias a todos por las comidas en la cafetería y los cafesito mientras os contaba mi vida del góspel.

Gracias mamá y papá porque siempre habéis estado ahí. Mamá parece que al final te he hecho caso en lo de hacer el doctorado, ¿no? Jeje. Gracias por estar siempre pendiente, siempre en la retaguardia. Gracias por tu frase “es más pensarlo que hacerlo”, porque muchas veces me ha dado las fuerzas que ya no me quedaban. Gracias papá porque cada vez que te veo me preguntas “¿cómo va la tesis?”, porque sé que te preocupas por mí y porque quieres que consiga lo que me propongo. Gracias también a mi abuelito Pepe, que tantas veces me ha sacado el libro de su tesis para enseñarme los compuestos químicos que descubrió con sus experimentos. Gracias porque me has transmitido “el gen” de querer ser doctora, y aquí estoy, ya casi doctora. Gracias al resto de mi familia, a Juanito y Miguel, a todos mis primos y mis tíos, porque sé que habéis estado pendientes de cerca de cómo iban mis investigaciones.

Muchas gracias a Manolo y a Mila y a Susy y a Samy, porque habéis estado apoyándome en cada momento, no sólo con palabras, sino también con oración. Gracias porque me habéis ayudado en cada paso que he dado, porque me habéis animado a que persevere y porque sé que los consejos que me dais son siempre sabios. Gracias por querer sacar siempre lo mejor de mí y enseñarme lo que es llevar una vida con propósito.

Gracias a mis compis de piso, que me han aguantado, especialmente esta última época de escritura... Gracias a la “Picky Hippie”, la americana que me ha solucionado todas mis dudas del inglés... “¿esto te suena bien en inglés?” “espera que lo lea: the *jcfgfslskdij* is a neurotrophin...” jaja. Gracias por tu buen humor, por tus “good morning, sunshine” de por las mañanas que nos alegran a toda la casa y por tus ánimos de rastafari que me han ayudado un montón! Gracias, Miri, porque has estado en los momentos donde ya estaba harta y me has dado perspectiva para seguir; gracias por aguantar mis frustraciones y mis alegrías, y mis conversaciones sobre conejos jaja. Gracias por aprenderte todas las historias que te cuento, aunque yo crea que no me escuchas...

¡Mariana! ¡Muchas gracias por ese pedazo de portada! Esto parece que se te da bien... Si es que alguien muy sabio ya lo dijo... es un oficio... jaja. Gracias por las veces que me cambias la manera de ver las cosas y lo útiles que han sido y son los consejos que me das para ver con perspectiva. Gracias Dan por esas palabras de aliento tan necesarias en los momentos más difíciles... Gracias por tu humor (Angels, té cuidat con l'escalinata) que me saca muchas carcajadas de las que me hacen llorar de la risa. Y Beth gracias también por tus ánimos y por cómo te has preocupado de que esté bien alimentada con chuches de animales jaja. Gracias Victoooooria y Debbie por los ánimos de cada día. Y por supuesto, gracias a mi fisio que ha utilizado su pulgarcito para quitarme las tortícolis y las contracturas derivadas de la tesis... ¡Gracias Paquita!

Gracias a todos los finqueros y a la gente que se me haya podido escapar, que si me pongo a escribir, los agradecimientos van a ser más largos que la propia tesis.

Y sobre todas las cosas, gracias a Dios porque Él ha sido el que realmente ha hecho posible que yo haya hecho esta tesis, porque me ha hecho levantar alas como las águilas. Gracias porque he podido indagar y descubrir un poquito más sobre Su Creación. Me alucina lo bien hechas

que están las cosas y las muchas horas que hay que estudiar para descubrir un poquito sobre una proteína de 13 kDa. Un universo con las cosas tan bien montadas y puestas de una manera tan lógica tiene detrás a un Ser pensante, que además no nos deja solos, sino que se preocupa de su creación. Las horas que he pasado investigando para hacer esta tesis no han hecho otra cosa que acercarme un poco más a Dios, intentando comprender cómo están hechas las cosas. Como dice Francis Collins, director del Proyecto Genoma Humano: “El Dios de la Biblia es también el Dios del genoma. Se le puede adorar en un templo o en un laboratorio. Su Creación es majestuosa, impresionante, compleja y hermosa”.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

GLOSARIO DE TÉRMINOS POR ORDEN ALFABÉTICO

RESUMEN	1
SUMMARY	7
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
1.1. El sistema del factor de crecimiento nervioso: NGF y sus receptores	13
1.1.1. Descubrimiento del NGF.....	13
1.1.2. Estructura molecular del NGF.....	14
1.1.3. Receptor de alta afinidad: TrkA.....	16
1.1.4. Receptor de baja afinidad: p75.....	18
1.2. Producción de proteínas recombinantes	19
1.2.1. Producción de proteínas utilizadas en reproducción animal.....	19
1.2.2. Producción de β -NGF.....	21
1.3. El sistema β -NGF en la reproducción del macho	22
1.4. El sistema β -NGF en la reproducción de la hembra	26
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	31
3. MATERIAL Y MÉTODOS	35
3.1. Diseños experimentales	37
3.1.1. Caracterización del sistema β -NGF en el macho.....	37
3.1.1.1. <i>Estudio de la expresión génica e inmunolocalización de β-NGF y sus dos receptores (TrkA y p75) en el tracto reproductor masculino de conejo durante la madurez sexual.....</i>	37
3.1.1.2. <i>Estudio de la relación de los niveles de β-NGF plasmáticos y del PS con los niveles de testosterona plasmática.....</i>	38
3.1.2. Producción y caracterización del β -NGF recombinante de conejo.....	40
3.1.2.1. <i>Secuenciación y producción de β-NGF recombinante de próstata de conejo.....</i>	40

3.1.2.2. Estudio de la secuencia proteica de NGF y comparación con especies de ovulación inducida y espontánea.....	40
3.1.2.3. Efecto de la adición del β -NGF recombinante sobre el semen puro de conejo.....	41
3.1.3. Ensayos in vitro e in vivo con el β -NGF recombinante.....	44
3.1.3.1. Efecto de la adición del β -NGF recombinante en la dosis seminal	44
3.1.3.2. Inducción de la ovulación en conejas mediante el β -NGF recombinante de conejo administrado por vía intravaginal en la dosis seminal.....	44
3.2. Animales e instalaciones	46
3.3. Protocolos experimentales	47
3.3.1. Recogida de semen y PS. Análisis de las características seminales....	47
3.3.2. Western blot (WB).....	49
3.3.3. Extracción de sangre y preparación de plasma sanguíneo.....	50
3.3.4. Enzimoimmunoensayo (ELISA).....	51
3.3.5. Extracción de ARN, producción de ADN complementario y PCR.....	53
3.3.6. Inmunohistoquímica.....	55
3.3.7. Producción recombinante de β -NGF de conejo.....	56
3.3.7.1. Secuenciación de β -NGF a partir de la próstata de conejo.....	56
3.3.7.2. Producción del plásmido y preparación de la secuencia para la transfección en células CHO.....	60
3.3.7.3. Cultivo y transfección de células CHO.....	61
3.3.7.4. Purificación de la proteína recombinante a partir del medio celular.....	61
3.3.7.5. MALDI-TOF.....	62
3.3.7.6. Ensayo de actividad biológica con células PC12.....	62
3.3.8. Estudio de la secuencia proteica del β -NGF recombinante en comparación con otras especies.....	66
3.4. Análisis estadísticos	67

4.1. Caracterización del sistema β -NGF en el aparato reproductor masculino de los conejos durante la madurez sexual y relación de los niveles de β -NGF plasmáticos y del plasma seminal con el nivel de testosterona plasmática	71
4.1.1. Expresión del ARNm de β -NGF, TrkA y p75 en el tracto reproductor masculino.....	73
4.1.2. Inmunolocalización de β -NGF, TrkA y p75 en el tracto reproductor masculino.....	73
4.1.2.1. β -NGF.....	75
4.1.2.2. Receptor de alta afinidad, TrkA.....	76
4.1.2.3. Receptor de baja afinidad, p75.....	76
4.1.3. Características seminales.....	83
4.1.4. Detección de β -NGF en PS.....	84
4.1.5. Concentraciones de β -NGF en PS y plasma sanguíneo y testosterona plasmática y correlación entre ellos.....	84
4.2. Producción recombinante de β -NGF de conejo y ensayo de su funcionalidad biológica	85
4.2.1. Secuenciación del NGF presente en la próstata de conejo, construcción del plásmido y producción del β -NGF recombinante.....	87
4.2.2. Actividad biológica de β -NGF recombinante en células PC12.....	88
4.2.2.1. Viabilidad.....	88
4.2.2.2. Análisis de diferenciación y crecimiento de neuritos.....	89
4.2.2.3. Inmunofluorescencia frente a β -III-tubulina.....	91
4.2.2.4. Inhibición del receptor TrkA.....	92
4.2.3. Estudio de la secuencia proteica de β -NGF recombinante en comparación con otras especies.....	93
4.2.4. Efecto de diferentes concentraciones de β -NGF recombinante sobre el semen puro de conejo.....	95
4.3. Estudio de la inducción de la ovulación con la proteína recombinante β -NGF de conejo adicionada en la dosis de inseminación	97

4.3.1. Estudio dosis-respuesta de β -NGF recombinante en semen diluido....	99
4.3.2. Estudio de la inducción de la ovulación con β -NGF recombinante en conejas.....	100
5. DISCUSIÓN	105
6. CONCLUSIONES	119
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
ANEXOS	147
Anexo I. Secuencia genética de NGF de próstata de conejo	149
Anexo II. Secuencia de NGF de próstata de conejo publicada en GenBank	150
Anexo III. Publicaciones y comunicaciones a congresos relacionados	151
Anexo IV. Artículo científico publicado relacionado con la tesis doctoral	156

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

Figura 1.1.	14
Secuencia de nucleótidos y aminoácidos alineadas de pro-NGF de conejo.	
Figura 1.2.	15
Estructura proteica del homodímero de β -NGF.	
Figura 1.3.	16
Unión del homodímero de β -NGF y dos moléculas de TrkA.	
Figura 1.4.	17
Unión del homodímero de β -NGF y una molécula del receptor p75.	
Figura 3.1.	40
Diseño experimental del objetivo 1.	
Figura 3.2.	43
Diseño experimental del estudio dosis-respuesta con diferentes concentraciones de β -NGF recombinante (0, 5, 10, 25, 50 y 100 ng/ml) en las células PC12.	
Figura 3.3.	44
Diseño experimental del efecto de diferentes concentraciones de β -NGF recombinante (0, 2, 20 y 100 ng/ml) sobre el semen puro de conejo a las 0, 1 y 2 horas tras su adición.	
Figura 3.4.	46
Diseño experimental de la prueba <i>in vivo</i> de conejas con administración intravaginal de diferentes concentraciones de β -NGF recombinante (0, 20 ng/ml, 100 ng/ml, 1 μ g/ml, 20 μ g/ml y 100 μ g/ml) en la dosis seminal.	
Figura 3.5.	47
Visualización macroscópica del tracto reproductor femenino y ovarios.	
Figura 3.6.	48
Nave y jaula de conejos de los Campos de prácticas de la ETSIAAB (UPM).	
Figura 3.7.	49
Procedimiento de recogida y análisis de semen.	
Figura 3.8.	50
Parámetros analizados mediante el CASA.	
Figura 3.9.	51
Conejos inmovilizados con cepos para la extracción sanguínea de la oreja.	

Figura 3.10.	53
Placas de ELISA antes y después de añadir la solución de frenado.	
Figura 3.11.	59
Esquema del fundamento de la técnica RACE.	
Figura 3.12.	61
Crecimiento de colonias blancas (1-6) que contienen el plásmido pD2539-CEF-NGF.	
Figura 3.13.	62
Columnas de purificación.	
Figura 3.14.	65
Procedimiento del raspado de los pocillos para la prueba de viabilidad de las células PC12.	
Figura 3.15.	66
Imagen de microscopio óptico de campo claro a 20x de un cultivo de células PC12.	
Figura 4.1.	75
Abundancia relativa de la expresión de ARNm de β -NGF, TrkA y p75 en próstata, glándula bulbouretral y cabeza y cola de epidídimo en conejos de 22 y 37 semanas de edad.	
Figura 4.2.	76
Tejidos positivos para β -NGF (hipófisis), TrkA (hipotálamo) y p75 (melanoma).	
Figura 4.3.	78
Localización de β -NGF en próstata, glándulas bulbouretrales, cabeza del epidídimo y cola del epidídimo en conejos de 22 semanas y 37 semanas de edad.	
Figura 4.4.	80
Localización de TrkA en próstata, glándulas bulbouretrales, cabeza del epidídimo y cola del epidídimo en conejos de 22 semanas y 37 semanas de edad.	
Figura 4.5.	82
Localización de p75 en próstata, glándulas bulbouretrales, cabeza del epidídimo y cola del epidídimo en conejos de 22 semanas y 37 semanas de edad.	
Figura 4.6.	85
Western blot de β -NGF vs. β -actina del PS de conejos de 22 y 37 semanas.	
Figura 4.7.	88
Construcción del plásmido que contiene la secuencia de NGF de conejo (empresa DNA 2.0).	

Figura 4.8.	89
WB de la proteína recombinante producida en medio de cultivo libre de proteínas y resultados de la búsqueda con MASCOT de la proteína detectada mediante MALDI-TOF.	
Figura 4.9.	90
Porcentaje de viabilidad celular en células PC12 a las 48 h de la adición de diferentes concentraciones de β -NGF recombinante (0, 5, 10, 25, 50 y 100 ng/ml).	
Figura 4.10.	91
Porcentaje de células diferenciadas (A) y de células con neuritos (B) tratadas con diferentes dosis de β -NGF recombinante (0, 5, 10, 25, 50 y 100 ng/ml) durante 8 días.	
Figura 4.11.	92
Longitud de los neuritos de las células PC12 tratadas con diferentes dosis de β -NGF recombinante (0, 5, 10, 25, 50 y 100 ng/ml) a día 8.	
Figura 4.12.	93
Inmunofluorescencia de células PC12 tras el tratamiento de 8 días con 25 ng/ml de β -NGF recombinante.	
Figura 4.13.	93
Ensayo de inhibición de TrkA en las células PC12 a las 48 h de cultivo.	
Figura 4.14.	95
Alineamiento de la secuencia proteica de NGF de diferentes especies de ovulación inducida y espontánea.	
Figura 4.15.	97
Viabilidad espermática y parámetros de motilidad y progresividad espermática analizados mediante el CASA a las 0, 1 y 2 h tras la adición de diferentes dosis de β -NGF recombinante (0, 2, 20 y 100 ng/ml).	
Figura 4.16.	101
Viabilidad espermática y parámetros de motilidad y progresividad espermática analizados mediante el CASA tras la adición de diferentes dosis de β -NGF recombinante (0 ng/ml, 20 ng/ml, 100 ng/ml, 1 μ g/ml, 20 μ g/ml y 100 μ g/ml).	
Figura 4.17.	103
Parámetros macroscópicos ováricos tras la administración intravaginal de diferentes dosis de β -NGF recombinante (0 ng/ml, 20 ng/ml, 100 ng/ml, 1 μ g/ml, 20 μ g/ml y 100 μ g/ml).	

Figura 4.18.	104
---------------------	------------

Concentraciones de LH en conejas ovuladas y no ovuladas a los 0, 30, 60 y 120 min tras la IA. 1) β -NGF recombinante (0 ng/ml, 20 ng/ml, 100 ng/ml, 1 μ g/ml, 20 μ g/ml y 100 μ g/ml) vía intravaginal, 2) 20 μ g de GnRH vía intramuscular (control positivo) o 3) con cánula y sin semen (control negativo).

Figura 4.19	105
--------------------	------------

Concentraciones de LH en conejas ovuladas y no ovuladas a los 0, 30, 60 y 120 min tras la IA. 1) β -NGF recombinante (0 ng/ml, 20 ng/ml, 100 ng/ml, 1 μ g/ml, 20 μ g/ml y 100 μ g/ml) vía intravaginal, 2) 20 μ g de GnRH vía intramuscular (control positivo) o 3) con cánula y sin semen (control negativo).

Tablas

Tabla 1.1.	19
-------------------	-----------

NGF recombinantes de diferentes especies producidas en distintas células.

Tabla 1.2.	21
-------------------	-----------

Especies donde se han encontrado β -NGF y/o sus receptores (TrkA y p75) en diferentes órganos sexuales masculinos.

Tabla 1.3.	26
-------------------	-----------

Especies donde se han encontrado β -NGF y/o sus receptores (TrkA y p75) en diferentes órganos sexuales femeninos.

Tabla 3.1.	54
-------------------	-----------

Primers de β -NGF y sus dos receptores para el análisis de PCR a tiempo real.

Tabla 3.2.	55
-------------------	-----------

Primers de una región conservada entre especies de β -NGF.

Tabla 3.3.	59
-------------------	-----------

Primers específicos diseñados para la técnica RACE.

Tabla 4.1.	83
-------------------	-----------

Características seminales en conejos de 22 y 37 semanas (n=6) con 3 replicados por cada edad.

Tabla 4.2.	84
-------------------	-----------

Concentración de β -NGF en PS y plasma sanguíneo (pg/ml) y testosterona en plasma sanguíneo (pg/ml) en conejos de 22 y 37 semanas.

GLOSARIO DE TÉRMINOS POR ORDEN ALFABÉTICO

ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
CASA	<i>Computer Assisted Semen Analysis</i> Análisis Computerizado de Semen
CL	Cuerpo lúteo
COS	<i>CV-1 in Origin with SV40 genes cells</i> Células originarias de células CV-1 con gen SV40
COX2	Ciclooxigenasa 2
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> Medio <i>Eagle</i> modificado por Dulbecco
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> Factor de crecimiento epidérmico
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> Factor de crecimiento fibroblástico
FSH	<i>Follicle-stimulating Hormone</i> Hormona folículo-estimulante
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
HEK293	<i>Human embrionic kidney cells 293</i> Células embrionarias de riñón humano 293
HeLa	Línea celular de Henrietta Lacks
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> Peroxidasa de rábano
IA	Inseminación artificial
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i> Factor de crecimiento similar a la insulina

IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LH	<i>Luteinizing hormone</i> Hormona luteinizante
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> Desorción/ionización láser asistida por matriz
MTT	3-(4,5-dimetil tiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromida
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i> Factor de Crecimiento Nervioso
OIF	<i>Ovulation-inducing factor</i> Factor inductor de la ovulación
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> Tampón fosfato salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> Reacción en cadena de polimerasa
PGE	Prostaglandina E
PGF2α	Prostaglandina F2 alfa
PS	Plasma seminal
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i> Amplificación rápida de las terminaciones de cDNA
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico
TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i> Receptor del factor de necrosis tumoral
TMB	3,3',5,5' tetrametilbencidina
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano-hidroclorido
Vía ERK/MAPK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinases / Mitogen-Activated Protein Kinases</i>

Señal extracelular regulada por quinasas / Proteínas quinasas activadas por mitógenos

Vía JNK

c-Jun N-terminal kinases

Quinasas c-Jun N-terminal

Vía NFκB

Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

Vía PI3K/AKT

Phosphoinositide 3-kinase / protein kinase B

Fosfoinositol-3-quinasa / Proteína quinasa B

XGal

5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido

3T3

3-day transfer, inoculum 3×10^5 cells

Células de 3 días de transferencia de inóculo de 3×10^5

RESUMEN

El factor de crecimiento nervioso (β -NGF) es una neurotrofina que se descubrió en el sistema nervioso y, posteriormente, en numerosas partes del organismo, entre ellos el sistema reproductor de muchas especies animales. Presenta importantes funciones durante el desarrollo de los órganos reproductores, como la espermatogénesis, la foliculogénesis, la maduración de los gametos y la ovulación. De hecho, se ha demostrado que es el denominado factor inductor de la ovulación (OIF) en especies de ovulación inducida, como los camélidos. En conejos, la presencia del sistema β -NGF (neurotrofina y sus dos receptores) se ha confirmado en algunos órganos masculinos (testículos, próstata y glándulas seminales) y femeninos (ovarios, oviducto, útero y cérvix) de animales adultos, pero no se ha caracterizado su papel durante el desarrollo sexual ni se conoce su relación con otras hormonas importantes en la reproducción, como la testosterona. Aunque el conejo es una especie de ovulación inducida, hasta el momento no se ha demostrado si el β -NGF provoca la ovulación como en camélidos puesto que los estudios realizados no han obtenido una respuesta ovulatoria adecuada con plasma seminal (PS) homólogo ni heterólogo, ni con β -NGF de origen murino.

Con el fin de profundizar en el estudio del sistema β -NGF en conejos, en la presente tesis doctoral se ha caracterizado este factor de crecimiento y sus dos receptores de alta (TrkA) y baja afinidad (p75) en el tracto reproductor masculino de conejo durante el periodo de la madurez sexual, así como su relación con la testosterona (objetivo 1). Además, para comprobar si la proteína es capaz de producir la ovulación en conejas, se ha llevado a cabo la producción recombinante de un β -NGF homólogo a partir de la secuencia prostática de conejo y se ha comparado la secuencia proteica con el de otras especies de ovulación inducida y espontánea, para explicar las posibles diferencias de la respuesta del conejo con respecto a otras especies (objetivo 2). También se ha testado en condiciones *in vitro* el efecto biológico de la proteína recombinante en células PC12 y en espermatozoides de conejo. Finalmente, se ha comprobado la respuesta ovulatoria y los efectos en hembras inseminadas con el β -NGF recombinante adicionado en la dosis seminal (objetivo 3).

Para llevar a cabo el **primer objetivo**, se recogieron tejidos (próstata, glándula bulbouretral y cabeza y cola de epidídimo), semen, plasma seminal (PS) y plasma sanguíneo de conejos en dos edades que comprenden el periodo de la madurez sexual (22 y 37 semanas, n=4 por edad). Se estudió la expresión génica de los tejidos mediante

técnicas de PCR a tiempo real y la inmunolocalización mediante inmunohistoquímica; la calidad seminal se analizó utilizando análisis computerizado de semen (CASA), y las concentraciones de β -NGF (en PS y plasma sanguíneo) y de testosterona (en plasma sanguíneo) se determinaron mediante la técnica de ELISA.

Los resultados con respecto a la expresión génica mostraron una gran abundancia de la neurotrofina en la próstata en comparación con el resto de tejidos en ambas edades estudiadas, tal y como se describe en otras especies. También fue mayor que la expresión de TrkA y p75, las cuales no variaron entre tejidos ni entre edades. La inmunolocalización del sistema β -NGF en próstata reveló ciertas diferencias en la distribución de la neurotrofina, de tal manera que, en los conejos más jóvenes, el β -NGF se localizó más intensamente en la zona apical de las células epiteliales prostáticas y en individuos mayores se localizó de manera más homogénea por todo el citoplasma. Los receptores se localizaron en las células epiteliales de este órgano, de manera homogénea e intensa en el caso de TrkA, y heterogénea en el caso de p75. En la glándula bulbouretral, el β -NGF únicamente se localizó en el tejido intersticial, mientras que ambos receptores mostraron una fuerte señal en las células epiteliales. El factor de crecimiento no se localizó en el epidídimo, mientras que el receptor TrkA se distribuyó en el intersticio y en las células epiteliales en ambas edades. Los dos receptores se localizaron en los estereocilios de la cabeza del epidídimo.

Por otro lado, en nuestro estudio, los parámetros seminales analizados mejoraron su respuesta durante la madurez sexual. Respecto al ambiente hormonal, los niveles plasmáticos de testosterona variaron entre las dos edades ($4427,9 \pm 1432,0$ pg/ml vs. $692,1 \pm 201,1$ pg/ml), aunque no se correlacionaron con la concentración de β -NGF en PS ni en plasma sanguíneo. Estas concentraciones se mantuvieron constantes en el PS ($1378,6 \pm 375,0$ pg/ml vs. $1240,3 \pm 270,4$, en conejos de 22 y 37 semanas respectivamente), al igual que en el plasma sanguíneo ($658,9 \pm 30,2$ pg/ml vs. $746,6 \pm 125,7$ pg/ml). Por tanto, se evidenció que los niveles de β -NGF son independientes de la concentración de testosterona en plasma sanguíneo en el conejo.

La función específica del sistema β -NGF en el tracto reproductor masculino del conejo es desconocida, pero los resultados obtenidos en este estudio apoyan ciertas hipótesis formuladas en otras especies. Así, la mayor expresión e inmunolocalización de la neurotrofina en la próstata sugiere que este órgano contribuye a la producción y a la secreción de β -NGF. De este modo, actuaría mediante mecanismos auto/paracrinós en la

próstata para ejercer sus funciones biológicas, como el desarrollo prostático o el aumento de la calidad del eyaculado mediante la mejora de la concentración y motilidad espermáticas, como se corroboró en nuestros análisis de la calidad seminal. A pesar de que hay muy pocos estudios del sistema β -NGF en la glándula bulbouretral, nuestros resultados sugieren que la neurotrofina participa en la funcionalidad de este órgano a través de sus dos receptores. Por otro lado, la presencia de TrkA y p75 en los estereocilios del epidídimo tiene cierta relevancia, ya que estas estructuras se encargan de asegurar una concentración seminal correcta. Todo ello sugiere una posible participación del β -NGF en la mejora de la calidad seminal aunque serán necesarios más estudios para analizar su posible papel en la fertilidad como se ha descrito en otras especies.

Una vez caracterizado el sistema β -NGF en el aparato reproductor masculino durante la madurez sexual de conejos, para llevar a cabo el **objetivo 2**, produjimos la proteína recombinante a partir de la secuencia de próstata de conejo, obtenida mediante técnicas de RACE y publicada en el GenBank con el número de acceso KX528686. El plásmido con el inserto del NGF secuenciado con una cola de histidina en el extremo C-terminal, se transfectó en células de ovario de hámster chino (CHO) y el medio de cultivo resultante se purificó mediante columnas de níquel. Los análisis de la proteína resultante mediante western blot y análisis de la huella peptídica por MALDI-TOF corroboraron que la proteína tenía el peso molecular y la secuencia proteica adecuados. La actividad biológica de la proteína recombinante se analizó en células de feocromocitoma de médula adrenal de rata (PC12) y en espermatozoides de conejo mediante estudios dosis-respuesta. Los resultados de estos ensayos demostraron que el β -NGF recombinante no afectaba a la viabilidad en ninguna de las células a las concentraciones testadas. Además, producía la diferenciación de las células PC12 a células tipo neurona de manera específica en todas las concentraciones estudiadas (0, 5, 10, 25, 50 y 100 ng/ml). En los espermatozoides, los parámetros de progresividad y motilidad se mantuvieron en todas las dosis (0, 2, 20 y 100 ng/ml) en el momento de adición al semen y después fueron decayendo a lo largo del tiempo (2 h) en los espermatozoides sometidos al tratamiento con la concentración más alta. La comparación de la secuencia proteica del β -NGF recombinante de conejo con otras especies mostró cambios en residuos específicos de unión a los receptores TrkA y p75, los cuales podrían explicar alguna de las particularidades de la reproducción de esta especie, aunque son necesarios más estudios para aclarar estas hipótesis.

Por último, se realizó un estudio dosis-respuesta *in vivo* para determinar el efecto del β -NGF recombinante sobre la inducción de la ovulación de las conejas administrado por vía intravaginal junto con la dosis seminal. Para ello, en primer lugar, se estudió la calidad espermática de las dosis de inseminación en las cuales se añadieron diferentes concentraciones de β -NGF recombinante (0 ng/ml, 20 ng/ml, 100 ng/ml, 1 μ g/ml, 20 μ g/ml y 100 μ g/ml). Las dosis mayores (20 y 100 μ g/ml) provocaron una gran disminución de la viabilidad y de los parámetros de motilidad y velocidad espermáticas. En los ensayos *in vivo*, las conejas inseminadas con β -NGF recombinante en la dosis de inseminación presentaron diferentes tasas de ovulación en función de la dosis administrada. De este modo, el 60% de las conejas inseminadas con 1 μ g/ml de β -NGF recombinante en la dosis seminal ovularon; de las conejas tratadas con 20 μ g/ml ovuló el 43% y de las del grupo de 20 ng/ml, el 30% de las del grupo de 20 ng/ml. Estas tasas de ovulación difirieron en todos los casos con la tasa de ovulación de las conejas tratadas con GnRH por vía intramuscular (grupo control positivo), que fue del 100%. El resto de grupos inseminados con la proteína recombinante mostraron unas tasas menores (20 y 14,3% en los grupos 100 ng/ml y 100 μ g/ml, respectivamente) que fueron similares a los resultados del grupo control negativo (inseminadas sólo con la cánula). El número de folículos hemorrágicos y cuerpos lúteos presentes fue semejante al del grupo control positivo. Asimismo, el número de folículos preantrales fue mayor en los grupos con mayores dosis de β -NGF recombinante. Por otro lado, los niveles de LH de las hembras tratadas con la neurotrofina no siguió el mismo patrón que el de las conejas del control positivo, observándose un retraso en la aparición del pico de LH aunque se alcanzaron niveles suficientes para ovular. La progesterona también aumentó en el día 7 post-inseminación y aparecieron vesículas embrionarias en todas las hembras ovuladas excepto en el grupo donde se emplearon 100 μ g/ml. Todos estos hallazgos demuestran que el β -NGF recombinante es capaz de inducir la ovulación en conejas de modo dosis-dependiente, mostrando efecto luteotrófico y folículo-estimulante, sin repercutir negativamente en el desarrollo embrionario temprano.

Las conclusiones resultantes de esta tesis doctoral indican que el sistema β -NGF se expresa de manera constante durante la madurez sexual en el tracto reproductor del conejo y presenta una inmunolocalización variable dependiendo del órgano y de la edad del animal. Además, la concentración de β -NGF en PS y plasma sanguíneo es independiente de la testosterona. También se ha logrado producir un β -NGF recombinante, a partir de

la secuencia de la próstata de conejo, que es funcional en células PC12 y mantiene la calidad espermática en el semen de conejo. Su secuencia de aminoácidos difiere con la de otras especies, lo que sugiere que estos cambios tienen cierta relevancia en la fisiología reproductiva del conejo. Por último, el β -NGF recombinante adicionado en la dosis seminal es capaz de inducir la ovulación en conejas por vía intravaginal presentando una respuesta dependiente de la dosis y manteniendo el estatus fisiológico durante el desarrollo embrionario temprano.

SUMMARY

The beta nerve growth factor (β -NGF) is a neurotrophin that was first discovered in the nervous system and then in other systems, such as the reproductive tract in many different species. In this system, it participates in the spermatogenesis and folliculogenesis, in gamete maturation and in the process of ovulation. In fact, it has been demonstrated that β -NGF is the ovulating-induction factor (OIF) in some reflex ovulator species, such as camelids. In rabbits, this factor and its two receptors (β -NGF system) are present in some tissues of male (testes, prostate and seminal glands) and female (ovary, oviduct, uterus and cervix) reproductive tract in adult animals. However, its role during sexual development and its relationship to some important hormones in reproduction, such as testosterone, are still unknown in this species. Furthermore, the ovulation in rabbits is induced by copulation but there is no clear evidence that β -NGF provokes the ovulation like in camelids, since neither murine β -NGF nor homologous or heterologous seminal plasma (SP) are able to trigger an appropriate ovarian response.

In order to go deeper into the study of the β -NGF system in rabbits, the first objective of the present doctoral Thesis was to characterize this growth factor and its high- (TrkA) and low- (p75) affinity receptors in the male reproductive tract during the sexual maturation process and its relationship to testosterone levels. Conversely, a novel recombinant β -NGF from the rabbit prostate sequence was produced and its protein sequence was compared with other spontaneous and induced-ovulation species (objective 2). The biological effect of this recombinant protein was tested in PC12 cells and in rabbit sperm. Finally, we performed an *in vivo* assay to evaluate the ovulation response and its effects in female rabbits (objective 3).

To carry out the first objective, male tissues (prostate, bulbourethral glands and epididymis), semen, SP and blood plasma were collected in two specific points of sexual maturity (22 and 37 weeks old, n=4 per age). Gene expression was assessed by real time PCR and immunolocalization was evaluated by immunohistochemistry; seminal quality was measured using computer-assisted sperm analysis (CASA) and β -NGF concentration (in SP and blood plasma) was assessed by ELISA.

Results from gene expression showed that β -NGF was higher in the prostate than in the rest of the tissues in both ages; the same as in other species. Also, it was higher than the TrkA and p75 expression. There were no differences in gene expression of the receptors between the two time-points studied. The neurotrophin was distributed with higher

intensity in the apical zone of epithelial cells in the prostate in younger animals, in comparison to older ones, where the neurotrophin was localized all over the cell cytoplasm. Both receptors were immunolocalized in these cells also, being TrkA more uniformly than p75. In bulbourethral glands, the distribution of β -NGF was restricted to interstitial tissue, whereas both receptors were present in epithelial cells. The neurotrophin was not present in the epididymis, but TrkA was immunolocalized in the interstitial tissue and epithelial cells in both ages. TrkA and p75 were present in the stereocilia of caput of epididymis.

On the other hand, the seminal parameters improved during the sexual maturity and testosterone plasma levels varied between both ages (4427.9 ± 1432.0 pg/ml vs. 692.1 ± 201.1 pg/ml in 22 and 37 week-old rabbits, respectively). However, these levels did not correlate to β -NGF concentration in neither SP (1378.6 ± 375.0 pg/ml vs. 1240.3 ± 270.4) nor blood plasma (658.9 ± 30.2 pg/ml vs. 746.6 ± 125.7 pg/ml), which did not change during the period analyzed. Therefore, β -NGF levels are independent of the plasma testosterone concentration in rabbits.

The specific function in the β -NGF system in the male rabbit reproductive tract is still unknown, but the results obtained in this study support some hypothesis made in other species. Thus, the greater expression and the immunolocalization of β -NGF in the prostate suggest that this organ contributes to the β -NGF production and secretion. Then, the neurotrophin may perform its biological effects in the prostate gland by auto/paracrine mechanisms, such as the prostatic development or the increase of sperm quality in terms of concentration and motility, as seen in our results. There are few studies of the β -NGF system in the bulbourethral gland and its function is unknown; however, our results suggest that the neurotrophin participates in its functionality through its receptors. Conversely, the presence of TrkA and p75 in the stereocilia is remarkable, since these structures contribute to an assurance of proper sperm concentration. All these results suggest a possible role of β -NGF in the improvement of seminal quality, although more studies are necessary to elucidate if it is also implicated in the fertility, as seen in other species.

Once the β -NGF system was characterized in the male reproductive tract during sexual maturity, a novel recombinant β -NGF was produced. First of all, gene sequence from rabbit prostate was obtained by RACE techniques and submitted to GenBank database (reference number KX528686). The NGF sequence was inserted into a plasmid and

transfected into Chinese hamster ovary cells (CHO). Culture media was purified by nickel columns and the protein was analyzed by western blot and MALDI-TOF techniques. Molecular weight of bands by WB and the protein sequence by peptide fingerprint corroborate the production of the recombinant protein. Bioassays in pheochromocytoma of the rat adrenal medulla cells (PC12) and rabbit sperm were carried out in dose-response studies. Results verified that the recombinant β -NGF maintained the cell viability in any of the concentrations tested. Moreover, it produced differentiation of PC12 cells into neuron-like cells in all concentrations studied (0, 5, 10, 25, 50 and 100 ng/ml). In rabbit sperm, progressivity and motility parameters were maintained in all doses (0, 2, 20 and 100 ng/ml) in the moment of the addition of the molecule and then they decreased over time (2 h) with the highest dose. The comparison of the amino acid sequence of the recombinant β -NGF from rabbit to other species revealed some changes in specific residues related to the binding of TrkA and p75, which may explain some of the physiological particularities of rabbit reproduction. However, more studies are necessary to clarify this hypothesis.

Finally, the effect in the ovulation response of the recombinant β -NGF administrated in the seminal dose via intravaginal was tested with a dose-response study in rabbit does. Therefore, first of all, the β -NGF concentrations (0 ng/ml, 20 ng/ml, 100 ng/ml, 1 μ g/ml, 20 μ g/ml and 100 μ g/ml) were assayed in the seminal doses. The highest concentrations (20 and 100 μ g/ml) caused a great reduction in the sperm viability and motility and velocity parameters. In the *in vivo* studies, the females inseminated with the recombinant β -NGF in the seminal doses presented different ovulation rates depending on the β -NGF dose. Thus, 60% of females inseminated with 1 μ g/ml, 43% inseminated with 20 μ g/ml and 30% inseminated with 20 ng/ml ovulated, being different from the positive control group (treated with GnRH via intramuscular), where 100% of rabbits ovulated. The rest of the supplemented groups had lower ovulation rates (20 and 14.3% in 100 ng/ml and 100 μ g/ml groups), similar to the negative control (stimulated with the insemination cannula). The number of hemorrhagic follicles and corpus luteum was similar to the positive control group. Furthermore, the number of preantral follicles was higher in the supplemented groups. Conversely, LH levels in β -NGF treated females had a different pattern than females treated with GnRH, showing a delay in the LH peak apparition, although levels were enough to provoke the ovulation. Progesterone concentrations increased 7 days after insemination and embryonic vesicles appeared in all ovulated

females, except in the group of 100 µg/ml. All these findings demonstrate that the recombinant β -NGF is able to induce the ovulation in female rabbits in a dose-dependent manner, showing luteotrophic and follicle-stimulant effects with no repercussion in early embryonic development.

The conclusions of this thesis are, first, that the β -NGF system is expressed in a constant manner during the sexual maturity in the rabbit male reproductive tract and its immunolocalization is variable depending on the organ and the age of the animal. Moreover, the β -NGF concentration in SP and blood plasma is independent of the plasma testosterone concentration. Second, a novel recombinant β -NGF was produced using the gene sequence from the rabbit prostate, which is functional in PC12 cells and maintains the seminal quality in rabbit sperm. Its amino acid sequence varies from other species in some specific sites where TrkA and p75 bind, suggesting some relevance of these changes in the reproductive physiology in rabbits. Finally, the recombinant β -NGF added in the seminal dose is able to provoke the ovulation in female rabbits via intravaginal, showing a dose-dependent response which maintains the physiological status of the early embryonic development.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. EL SISTEMA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO: NGF Y SUS RECEPTORES

1.1.1. Descubrimiento del NGF

El factor de crecimiento nervioso (NGF, de sus siglas en inglés *Nerve Growth Factor*) fue el primer factor de crecimiento en descubrirse, gracias a Rita Levi-Montalcini (1909-2012), quien recibió el Premio Nobel de Medicina en 1986 junto con Stanley Cohen por el descubrimiento de este factor y del factor de crecimiento epidérmico (EFG).

El NGF se descubrió de manera fortuita realizando estudios sobre el cambio en la inervación sensitiva y simpática de embriones de pollo a los que se extirpaba una extremidad, desarrollados en la Universidad de Washington (St. Louis), por Viktor Hamburger y Levi-Montalcini (Hamburger y Levi-Montalcini, 1949). También participó en estos trabajos Elmer Bueker, quien administró células del sarcoma 180 de ratón a embriones de pollo con las extremidades extirpadas y observó un aumento en la inervación periférica en el lado donde se inoculaba el tumor (Bueker, 1948). Siguiendo en esta línea, se utilizaron los sarcomas 180 y 37 de ratón en cultivos *in vitro* de embriones de pollo, y se concluyó que estas células tumorales secretaban un agente que se difundía hasta el tejido, promoviendo un gran crecimiento nervioso de las fibras nerviosas ganglionares, al cual denominaron “factor estimulante del crecimiento nervioso” (Levi-Montalcini *et al.*, 1954). Posteriormente, el bioquímico Stanley Cohen comenzó a participar en las investigaciones para analizar bioquímicamente este factor de crecimiento, para lo cual utilizó veneno de serpiente, que contiene grandes cantidades de la enzima fosfodiesterasa. En estos estudios descubrieron que el veneno de serpiente también poseía en grandes cantidades el mismo factor de crecimiento que aparecía en las células tumorales (Cohen y Levi-Montalcini, 1956). Años más tarde, también se detectó en la glándula submaxilar del ratón (Levi-Montalcini y Cohen, 1960).

El NGF ha constituido la base para la investigación en la neurociencia moderna, y ha permitido el desarrollo de tratamientos para enfermedades nerviosas degenerativas, tales como el Alzheimer, el Parkinson o la enfermedad de Huntington, y enfermedades psiquiátricas, como la depresión, la esquizofrenia y la anorexia/bulimia nerviosas (Aloe y Chaldakox, 2013).

Tras su descubrimiento en el sistema nervioso, este factor comenzó a investigarse en el resto de tejidos y aparecieron nuevos estudios en los sistemas inmunológico (Otten *et al.*,

1989; Indo *et al.*, 2010, Minnone *et al.*, 2017), cardiorrespiratorio (Clegg *et al.*, 1989, Caporali *et al.*, 2009), dérmico (Pincelli y Yaar, 1997, Pincelli y Marconi, 2000), reproductor (Harper and Thoenen, 1980), etcétera.

1.1.2. Estructura molecular del NGF

El NGF forma parte de la familia de las neurotrofinas, factores de crecimiento presentes en el sistema nervioso que favorecen la supervivencia y diferenciación de las neuronas. A esta familia pertenecen el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés *brain-derived nerve growth factor*) (Barde *et al.*, 1982, Davies *et al.*, 1986), la neurotrofina 3 (NT-3) (Jones y Reichardt, 1990), 4 (NT-4, también conocida como NT-4/5) (Bothwell, 2016) y las neurotrofinas 6 (NT-6, Götz *et al.*, 1994) y 7 (NT-7, Nilsson *et al.*, 1998, Lai *et al.*, 1998), presentes en peces.

El NGF se sintetiza como una pre-pro-proteína de 241 aminoácidos, con 18 aminoácidos en el extremo N-terminal, que corresponden al péptido señal (Fig. 1.1). Este péptido señal aparece en la mayoría de las proteínas que se secretan, y constituye el código para comenzar el recorrido por el sistema membranoso celular (Kliemann *et al.*, 2007). Se escinde en el retículo endoplasmático, y posteriormente se produce una serie de glicosilaciones en la secuencia de pro-NGF (señaladas en la figura 1.1), que son necesarias para el transporte al aparato de Golgi (Shooter, 2001). La escisión de la parte “pro” puede llevarse a cabo durante la vía de secreción o tras la secreción (Bothwell, 2016); de cualquier manera, se escinde mediante la enzima furina y otras enzimas proteolíticas (Farahdi *et al.*, 1997). El dominio “pro” en las neurotrofinas actúa facilitando y estimulando el plegamiento oxidativo de la proteína madura (Rattenholl *et al.*, 2001), y seleccionando a estas hacia rutas secretoras o constitutivas (Lee *et al.*, 2001).

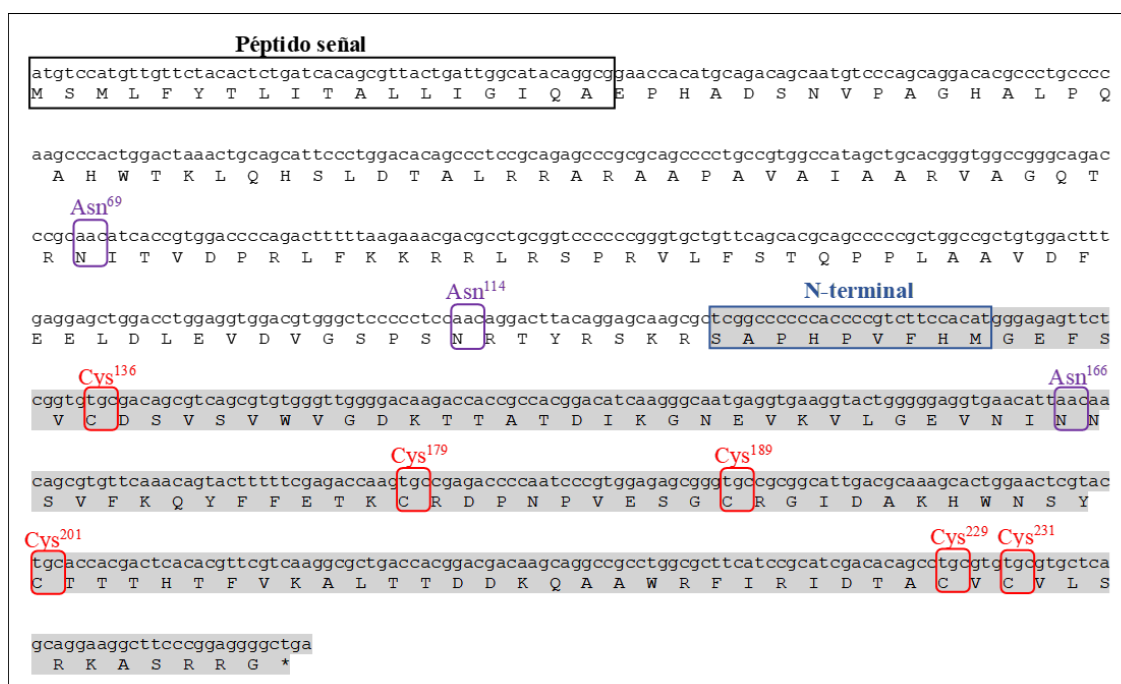


Figura 1.1. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos alineadas de pro-NGF de conejo. Se muestra el péptido señal en un recuadro negro y el extremo N-terminal de la porción beta del NGF (β -NGF), que está subrayada en gris. Los sitios de glicosilación de pro-NGF están recuadrados en morado; las cisteínas que participan en la formación de puentes disulfuro están señaladas con cuadros rojos. Elaborado con Serial Cloner 2.6.

Asimismo, se ha descrito que el pro-NGF también es capaz de secretarse al medio extracelular, mostrando diferente afinidad por los receptores de β -NGF y uniéndose a otros receptores, como la sortilina, que actúa como co-receptor para la señalización de muerte celular (Lee *et al.*, 2001, Bradshaw *et al.*, 2015). En el sistema nervioso, se ha postulado la necesidad de que exista un equilibrio entre los niveles de β -NGF y pro-NGF, ya que aumentos de pro-NGF y del receptor no específico de neurotrofinas, p75, al que se puede unir, se han relacionado con daños neuronales (Harrington *et al.*, 2004).

Para la formación del NGF maduro (β -NGF) debe ocurrir una serie de cambios post-traduccionales ya que la molécula está formada por dos monómeros idénticos (Fig. 1.2), dispuestos en paralelo, que se unen entre sí mediante una estructura denominada “nudo de cisteína”. Esta estructura está formada por dos puentes disulfuro que se unen formando un anillo cerrado, por el cual se introduce un tercer puente disulfuro. Los tres puentes disulfuro en esta conformación confieren al homodímero una alta estabilidad (Wiesman y Vos, 2001). Todos estos cambios post-traduccionales son fundamentales para que la proteína ejerza su función biológica en los tejidos diana, mediante sus dos receptores: TrkA, receptor específico de alta afinidad, y p75, receptor no específico de baja afinidad;

el conjunto del β -NGF y sus dos receptores se conoce comúnmente con el nombre de “sistema β -NGF”.

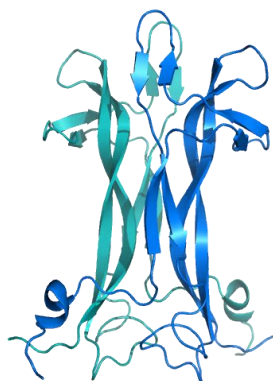


Figura 1.2. Estructura proteica del homodímero de β -NGF. Cada monómero está representado por un color. Elaborado con PyMol Molecular Graphics System. Código PDB: 5LSD (Paoletti et al., 2016).

1.1.3. Receptor de alta afinidad: TrkA

El receptor TrkA pertenece a la familia de receptores tirosina-quinasa, que incluye también a los receptores del resto de neurotrofinas: TrkB (receptor del BDNF y de NT-4/5) y TrkC (receptor de la NT-3). TrkA es activado por β -NGF, aunque la NT-3 a altas concentraciones también puede unirse a este (Sofroniew *et al.*, 2001). Son receptores transmembrana que tienen un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. Cuando el ligando se une al dominio extracelular, con afinidades de concentraciones de picomolar, se produce la dimerización del receptor, que conlleva a su autofosforilación y se desencadenan cascadas de señalización celular, como las vías ERK/MAPK o PI3K/AKT, implicadas en los procesos de regulación del ciclo celular (Song y Yoo, 2011).

Sitios de unión de β -NGF a TrkA

La porción extracelular del receptor tiene 5 dominios, de los cuales el último tiene un papel directo en la unión con el ligando (Wiesman y Vos, 2001). Cuando la neurotrofina se une al receptor hay dos superficies importantes de contacto: una región muy conservada en todas las neurotrofinas, que confiere afinidad al receptor, y otra no tan conservada, que se encarga de la selectividad del receptor (Bothwell *et al.*, 2014).

El sitio de unión específico de β -NGF a TrkA se encuentra en la región N-terminal del β -NGF (Fig. 1.3) (Wehrman *et al.*, 2007), donde los aminoácidos que lo constituyen forman un segmento corto de hélice que se empaqueta próximo al receptor, creando un ambiente hidrofóbico con los aminoácidos de TrkA. Esta unión se realiza entre una de las cadenas del homodímero de β -NGF y el receptor. Los efectos biológicos de la neurotrofina disminuyen drásticamente al realizar mutaciones génicas a nivel del N-terminal de β -NGF. Así, mutaciones génicas en los cinco primeros residuos de β -NGF provocan una disminución del efecto biológico de hasta 9 veces (Shih *et al.*, 1994), mientras que el efecto disminuye hasta 200 veces con mutaciones génicas de los 10 primeros residuos (Kahle *et al.*, 1992).

El otro sitio de unión a TrkA se encuentra en la parte de β -NGF que contacta con la región C-terminal del receptor y, en este caso, participan las dos cadenas del dímero de β -NGF. Los aminoácidos del ligando que participan en la unión están muy conservados entre las neurotrofinas y entre las diferentes especies. Entre ellos destacan el triptófano 21 (Trp²¹) y la fenilalanina 54 (Phe⁵⁴), que parecen ser importantes en la unión de alta afinidad al receptor, ya que mutaciones génicas de estos significan menores tasas de unión (Ibáñez *et al.*, 1993, Wiesman y Vos, 2001). Por otro lado, la isoleucina de la posición 31 (Ile³¹) y la fenilalanina 86 (Phe⁸⁶) participan en la unión pero no son tan importantes como los anteriores (Wiesman y Vos, 2001).

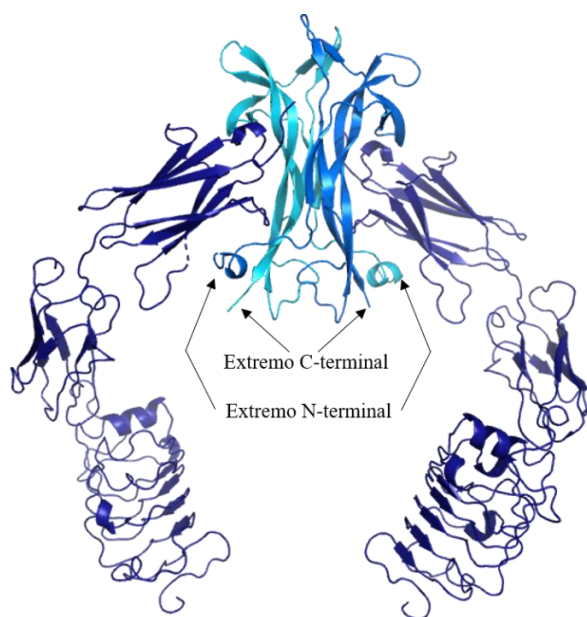


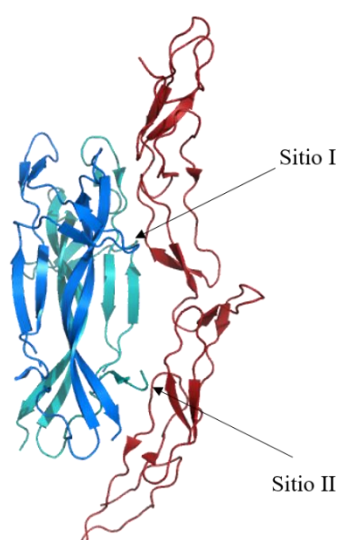
Figura 1.3. Unión del homodímero de β -NGF (azules claro) y dos moléculas de TrkA (azul oscuro). Se señalan los extremos C- y N-terminal de las dos cadenas de β -NGF. Elaborado con PyMol Molecular Graphics System. Código PDB: 2IFG (Wehrman *et al.*, 2007).

1.1.4. Receptor de baja afinidad: p75

El p75 es miembro de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) y es capaz de unirse a todas las neurotrofinas. Consta de un dominio citoplasmático (*death domain*) y un dominio extracelular, con cuatro repeticiones ricas en cisteína, requeridas para la unión con β -NGF (Wiesmann y Vos, 2001). Sus efectos biológicos se han relacionado mayormente con el control de la viabilidad celular regulando la apoptosis y con la cooperación del aumento de la afinidad de otros receptores (Lorigados-Pedre y Bergado-Rosado, 2004), mediante diferentes vías de señalización celular como las vías de JNK y NF κ B (Sofroniew *et al.*, 2001). En los últimos años se ha comprobado que p75 se puede unir también a las formas inmaduras de las neurotrofinas, pero es necesaria la asociación con sortilina para promover esta unión (Bothwell *et al.*, 2014). Por otro lado, muchos estudios han demostrado que la presencia de p75 facilita la señalización de Trk; de hecho, cuando p75 se co-expresa con TrkA, se forma un complejo de alta afinidad que potencia la señalización de TrkA y sus posteriores efectos (Gentry *et al.*, 2004).

Sitios de unión de β -NGF a p75

El β -NGF se une a p75 con una estequiometría 2:1 (monómero β -NGF: p75), ya que esta unión produce una flexión en la molécula de β -NGF que impide que una segunda molécula de p75 se una a la neurotrofina (He y Garcia, 2004). La superficie de p75 está cargada negativamente, de tal manera que la carga básica de β -NGF en dos puntos



específicos de la molécula (sitio I y sitio II) facilita la unión ligando-receptor; estos puntos de unión se sitúan en la parte superior e inferior de β -NGF y están formados por aminoácidos básicos, entre ellos argininas y lisinas (Fig. 1.4). Se ha comprobado que las mutaciones génicas en estos producen un descenso en la unión del receptor con el ligando, y por tanto un menor efecto biológico (Ibáñez *et al.*, 1992; Rydén *et al.*, 1997).

Figura 1.4. Unión del homodímero de β -NGF (azules claro) y una molécula del receptor p75 (rojo oscuro). Se señalan los sitios de unión ligando-receptor. Elaborado con PyMol Molecular Graphics System. Código PDB: 1SG1 (He *et al.*, 2004).

1.2. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

1.2.1. Producción de proteínas utilizadas en reproducción animal

Las proteínas más frecuentes que se emplean en animales son aquellas que juegan un papel importante en la reproducción, en la eficiencia productiva y en la sanidad animal (Gifre *et al.*, 2017). En el ámbito de la reproducción, las hormonas exógenas se han utilizado para la regulación de la función reproductiva del macho, para la regulación del ciclo reproductivo de la hembra y para el mantenimiento de la gestación, con dos propósitos principales: aumentar la fertilidad femenina (regulando la ovulación y facilitando la implantación embrionaria) e incrementar la calidad de la carne de machos esterilizados (Gifre *et al.*, 2017). Para ello, tradicionalmente, se han purificado hormonas (FSH, LH, GnRH, gonadotropina coriónica o inhibina) de material biológico, como la hipófisis o la placenta (Adams y Boime, 2008). Sin embargo, la purificación a partir de tejidos animales tiene diversos inconvenientes:

1. Debido a que la purificación se realiza a partir de material biológico, los lotes no son homogéneos entre ellos, ya que los animales de los que se extraen los tejidos poseen variaciones individuales, lo que implica, a la hora de la administración de las hormonas purificadas, una diversidad en las respuestas fisiológicas, diferentes vidas útiles de las hormonas purificadas y falta de reproducibilidad de los resultados (Murphy *et al.*, 1984; Adams y Boime, 2008).
2. En el proceso de purificación no siempre se obtiene la hormona pura, es decir, pueden existir otras hormonas que deriven en una variación de la acción específica de la hormona de interés (Koning *et al.*, 1994).
3. Hay peligro de transmisión de enfermedades bacterianas, víricas o transmitidas por priones del animal del cual se purifica la hormona al individuo que recibe el tratamiento hormonal (Adams y Boime, 2008, Hesser *et al.*, 2011).

Por ello, la producción de proteínas recombinantes para optimizar la reproducción en las granjas está en auge (Adams y Boime, 2008, Hesser *et al.*, 2011, Gifre *et al.*, 2017). Frente a las proteínas purificadas de tejidos animales, la producción de proteínas recombinantes permite una mayor pureza, potencia biológica y consistencia entre lotes de hormonas, un control sobre la composición de aminoácidos y carbohidratos, que las hacen aptas para fines farmacológicos, y una producción de proteínas libres de enfermedades y contaminantes (Koning *et al.*, 1994, Adams y Boime, 2008). Esto permite obtener

resultados específicos y reproducibles de los efectos biológicos de las hormonas recombinantes (Koning *et al.*, 1994).

Para la producción y purificación de una proteína recombinante, el primer paso a realizar es la secuenciación de la proteína y su inserción en un plásmido o vector (Oliveira y Domingues, 2018). En el diseño molecular es importante planificar el método de purificación posterior ya que puede ser necesario incluir colas de aminoácidos en un extremo de la secuencia. Por ejemplo, es muy frecuente la inclusión de colas de histidina (6 o 7 histidinas seguidas) en el extremo N- o C-terminal de la proteína de interés, para así después poder purificar mediante columnas de níquel, donde se adhieren las histidinas (Kuo y Chase, 2011). Cuando el plásmido tiene el inserto de la secuencia proteica, se transfecta en células, que se van a multiplicar para así obtener grandes cantidades de plásmido y, consecuentemente, de proteína. Estas células pueden ser procariotas, como *Escherichia coli* (Zhou *et al.*, 2018), levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae* (Vieira Gomes *et al.*, 2018), o eucariotas, como células de insecto (línea celular HEK293, Thomas y Smart, 2005) o de mamífero (línea celular CHO, Kim *et al.*, 2012). Estas células se cultivan en un ambiente con un componente restrictivo, como un antibiótico, al cual es resistente el plásmido por poseer en su secuencia un gen de resistencia a este componente. De esta manera, sólo se seleccionan aquellas células que contienen el plásmido en su interior. En el proceso de multiplicación celular, el material genético es traducido a proteínas, entre las cuales se encuentra la proteína diana, que puede ser secretada al medio extracelular. Por diferentes métodos de purificación, como intercambio de iones o columnas de purificación, se obtiene la proteína de interés.

La línea celular de ovario de hámster chino (CHO) se utiliza de manera frecuente para la producción de proteínas recombinantes útiles en reproducción animal, ya que la transfección de los plásmidos a estas células es sencilla y además, al ser células de mamífero, cuentan con la maquinaria intracelular encargada de las modificaciones post-traduccionales, permitiendo que el plegamiento y el ensamblaje de las proteínas sean los adecuados (Adams y Boime, 2008, Hesser *et al.*, 2011). Otra de las ventajas del uso de estas células es que secretan la proteína al medio extracelular, facilitando así su recuperación y purificación (Adams y Boime, 2008, Hesser *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2014). Asimismo, la producción recombinante de proteínas con una secuencia proteica específica de una especie, permite realizar investigaciones con proteínas homólogas en la especie animal de interés (Hakola *et al.*, 1997).

1.2.2. Producción de β -NGF recombinante

Tras el descubrimiento de la abundancia de NGF en la glándula submaxilar de ratón, se comenzó a purificar el factor a partir de esta glándula (Levi-Montalcini y Cohen, 1960). Sin embargo, se han puesto a punto las técnicas moleculares recombinantes explicadas en el apartado anterior para obtener β -NGF recombinante a partir de cultivos celulares, obteniendo la proteína en humano, ratón rata y pollo, como se muestra en la tabla 1.1.

Tabla 1.1. NGF recombinantes de diferentes especies producidas en distintas células. Células COS: células originarias de células CV-1 con gen SV40; fibroblastos de ratón 3T3: Células de fibroblastos de ratón de 3 días de transferencia de inóculo de 3×10^5 ; células HeLa: línea celular proveniente de cáncer cérvico-uterino de la paciente Henrietta Lacks; CHO-S: células CHO en suspensión; HEK293: células embrionarias de riñón humano 293.

Especie de procedencia	Células donde se produce	Referencia bibliográfica
Humano	Células de insecto	Edwards <i>et al.</i> , 1988
Ratón	<i>Escherichia coli</i>	Hu y Neet <i>et al.</i> , 1988
Rata	Células COS	Hallböök <i>et al.</i> , 1988
Pollo	Células COS	Hallböök <i>et al.</i> , 1988
Rata	Fibroblastos de ratón 3T3	Ernfors <i>et al.</i> , 1989
Humano	Células COS	Bruce y Heinrich, 1989
Humano	Células CHO	Iwane <i>et al.</i> , 1990
Humano	Células CHO	Kakihana <i>et al.</i> , 1993
Humano	<i>Escherichia coli</i>	Zhang <i>et al.</i> , 1997
Humano	<i>Escherichia coli</i>	Mari <i>et al.</i> , 1999
Ratón	Fibroblastos de ratón 3T3	Song y Chen, 2003
Humano	Células HeLa	Colangelo <i>et al.</i> , 2005
Humano	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	Vigentini <i>et al.</i> , 2006
Ratón	Células CHO-S	Xu <i>et al.</i> , 2014
Humano	Células HEK293	Li <i>et al.</i> , 2015
Humano	<i>Escherichia coli</i>	Gholami Tilko <i>et al.</i> , 2017

Para determinar si el β -NGF producido y purificado tiene función biológica, se pueden utilizar embriones de pollo y valorar el crecimiento neuronal que produce el β -NGF, o también realizar pruebas *in vitro*. En muchos estudios, se utiliza una línea celular de feocromocitoma de médula adrenal de rata, denominada PC12 (Gunning *et al.*, 1981, Kakihana *et al.*, 1993, Cordeiro *et al.*, 2000, Katzir *et al.*, 2003, Grau y Green, 2012, Cho *et al.*, 2016). Son células redondeadas, indiferenciadas, que, ante la presencia de β -NGF en el medio de cultivo celular, se diferencian en células tipo neurona desarrollando

prolongaciones citoplasmáticas llamadas neuritos (Das *et al.*, 2004). Estos ensayos de actividad biológica son necesarios para comprobar si la proteína recombinante es activa.

1.3. EL SISTEMA β -NGF EN LA REPRODUCCIÓN EN EL MACHO

La presencia de β NGF y sus receptores se han descrito en el tracto reproductor masculino de diferentes especies (se muestra en la tabla 1.2).

Tabla 1.2. Especies donde se han encontrado β -NGF y/o sus receptores (TrkA y p75) en diferentes órganos sexuales masculinos.

Especie	Tejido	β NGF	TrkA	p75	Referencia bibliográfica
Hámster, Humano, Rata, Ratón, Conejo	Conducto deferente, glándula seminal, próstata, glándula coagulante, prepucio, glándula bulbouretral, ampolla, testículos	✓	✗	✗	Harper y Thoenen, 1980
Cobaya	Próstata	✓	✗	✗	Shikata <i>et al.</i> , 1984
Rata, Ratón	Epidídimo, testículos	✓	✗	✗	Ayer LeLievre <i>et al.</i> , 1988
Rata, Ratón	Testículos	✗	✗	✓	Russo <i>et al.</i> , 1994
Rata	Testículos	✗	✗	✓	Persson <i>et al.</i> , 1990
Rata	Testículos	✓	✓	✓	Parvinen <i>et al.</i> , 1992 Djakiew <i>et al.</i> , 1994 Levanti <i>et al.</i> , 2006
Rata	Testículos	✓	✓	✗	Cupp <i>et al.</i> , 2000
Rata	Testículos, conducto eferente y deferente, epidídimo, glándula seminal y coagulante, próstata	✓	✓	✓	Li <i>et al.</i> , 2005
Rata	Conducto deferente, glándula seminal, próstata	✓	✓	✗	Squillacioti <i>et al.</i> , 2009
Humano	Testículos	✓	✓	✓	Seidl y Holstein, 1990 Müller <i>et al.</i> , 2006
Humano	Próstata	✓	✗	✗	Djakiew <i>et al.</i> , 1991
Humano	Próstata	✗	✓	✓	Guate <i>et al.</i> , 1999
Cobaya, Rata, Ratón	Próstata, conducto deferente, epidídimo, glándula seminal, testículos	✓	✗	✗	MacGrogan <i>et al.</i> , 1991
Toro	Testículos	✗	✗	✓	Wrobel <i>et al.</i> , 1996
Humano, Ratón	Testículos, epidídimo	✓	✓	✓	Russo <i>et al.</i> , 1999
Mono	Testículos, epidídimo, glándula seminal, próstata	✓	✓	✓	Jin <i>et al.</i> , 2006
Alpaca	Testículos	✓	✗	✗	Wang <i>et al.</i> , 2011
Gallo	Testículos	✓	✓	✗	Ma <i>et al.</i> , 2015
Ardilla de tierra	Testículos	✓	✓	✓	Zhang <i>et al.</i> , 2015
Conejo	Próstata, testículos, glándula seminal	✓	✓	✓	Maranesi <i>et al.</i> , 2015

Los **testículos** han sido el órgano más estudiado debido a la función tan importante que desempeñan en el desarrollo de los gametos masculinos. El β -NGF se ha localizado en las células de Sertoli, encargadas de regular la división y el desarrollo de las espermatogonias mediante los productos de su secreción, como los estrógenos, la inhibina, la activina, la proteína de unión a andrógenos, el lactato o el piruvato; estas células actúan por influencia de la FSH y regulan la concentración de testosterona, dihidrotestosterona y estrógenos a través de sus secreciones (Rebollar, 2017). También se ha detectado el sistema β -NGF en las células de Leydig, que contienen receptores de LH en su superficie, y son las encargadas de sintetizar andrógenos (especialmente testosterona) en respuesta a niveles elevados de LH, que se une a sus receptores de membrana. En relación con los niveles de andrógenos, se ha descrito que el sistema β -NGF está regulado por los andrógenos en ratas (Persson *et al.*, 1990, Lönnerberg *et al.*, 1992, Squillacioti *et al.*, 2009), aunque ha resultado ser independiente en cobayas (MacGrogan *et al.*, 1991), lo cual pone de manifiesto que la regulación de este sistema por los andrógenos es dependiente de la especie. Por otro lado, la neurotrofina y sus receptores se han localizado en células espermáticas en diferentes estadios. Estos hallazgos ponen en evidencia su importancia fisiológica en la motilidad espermática (Ayer-LeLievre *et al.*, 1988), así como en la espermatogénesis por estimular la meiosis de manera auto/paracrina a través de los receptores de β -NGF presentes en las células de Sertoli (Djakiew *et al.*, 1994, Levanti *et al.*, 2006, Perrard *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2011, Ma *et al.*, 2015, Maranesi *et al.*, 2015, Zhang *et al.*, 2015) y a través de la interacción con la testosterona y otros factores de crecimiento (Parvinen *et al.*, 1992). También participan en el mantenimiento estructural y funcional de los túbulos seminíferos (Seidl y Holstein, 1990, Russo *et al.*, 1994) durante el desarrollo y la vida adulta (Levanti *et al.*, 2006), en la regulación de la morfogénesis, diferenciación e innervación testicular (Russo *et al.*, 1994, Russo *et al.*, 1999, Cupp *et al.*, 2000, Muller *et al.*, 2006) y en la determinación morfológica del sexo durante el estadio prenatal (Cupp *et al.*, 2000).

La expresión del sistema β -NGF en el **epidídimo** (Ayer LeLievre *et al.*, 1988, MacGrogan *et al.*, 1991, Russo *et al.*, 1999, Li *et al.*, 2005) se ha relacionado con los procesos de maduración que sufre el espermatozoide hasta llegar a la uretra, como son la reabsorción del fluido que procede de los túbulos seminíferos, la pérdida de la gota citoplasmática, la condensación del material genético y la maduración del acrosoma (Rebollar, 2017).

Asimismo, se ha asociado con el desarrollo de la innervación y a la diferenciación celular del epidídimo (Russo *et al.*, 1999).

Por su lado, la **próstata**, que secreta moléculas y proteínas relacionadas con la activación y la capacitación espermáticas que tienen lugar tras la eyaculación (Verze *et al.*, 2016), es el órgano masculino con mayor abundancia de β -NGF en la mayoría de especies revisadas (Harper y Thoenen, 1980, Bogle *et al.*, 2018). Los estudios que han localizado el sistema β -NGF en este órgano (Li *et al.*, 2005, Jin *et al.*, 2006) relacionan su presencia con la síntesis, almacenamiento y secreción de β -NGF en las células epiteliales glandulares (Shikata *et al.*, 1984, MacGrogan *et al.*, 1991) y con el crecimiento y diferenciación de las células epiteliales de la próstata mediante mecanismos auto/paracrinós (Maranesi *et al.*, 2015). Además, en humanos, esta neurotrofina se ha relacionado con el cáncer de próstata (Djakiew *et al.*, 1991, Guate *et al.*, 1999).

Las mismas funciones del sistema β -NGF en la próstata han sido sugeridas también en las **glándulas o vesículas seminales** (MacGrogan *et al.*, 1991, Maranesi *et al.*, 2015), que contribuyen a la motilidad espermática, al incremento de la estabilidad en la cromatina del espermatozoide y a la supresión inmune del tracto de la hembra para evitar el rechazo (Gonzales, 2001).

La **glándula bulbouretral** tiene como función principal la secreción de un fluido que neutraliza la acidez de la orina residual de la uretra, así como la acidez del tracto femenino, actuando como defensa en el aparato reproductor de la hembra (Chughtai *et al.*, 2005). Sin embargo, hay muy pocos estudios que estudien la localización del sistema β -NGF en la glándula bulbouretral, y su función en este órgano todavía no se ha aclarado.

Todas las glándulas sexuales accesorias se encargan de producir el **plasma seminal** (PS), que acompaña a las células espermáticas en el eyaculado (Castellini, 2008, Gonzalez-Cadavid *et al.*, 2014). Se ha determinado que ciertas proteínas presentes en el PS desempeñan funciones importantes como la protección, el transporte, la capacitación y la motilidad espermáticas en el tracto reproductor femenino (Rodriguez-Martínez *et al.*, 2011, Simmons y Fitzpatrick, 2012). En este sentido, se ha detectado β -NGF en el PS de diversas especies: llamas (Ratto *et al.*, 2012, Tanco *et al.*, 2012, Ulloa-Leal *et al.*, 2014, Silva *et al.*, 2014, Bogle *et al.*, 2018), alpacas (Kershaw-Young *et al.*, 2012, Stuart *et al.*, 2015, Bogle *et al.*, 2018), camellos (Kumar *et al.*, 2013), toros (Harper *et al.*, 1982, Druart *et al.*, 2013, Bogle *et al.*, 2018), conejos (Maranesi *et al.*, 2015, Garcia-Garcia *et al.*,

2018a, Casares-Crespo *et al.*, 2018b, Maranesi *et al.*, 2018), caballos (Druart *et al.*, 2013) cérvidos (Bogle *et al.*, 2018) y humanos (Heinrich y Meyer, 1988, Li *et al.*, 2010a). Sus concentraciones varían según la especie, pero las más elevadas aparecen en camélidos (llamas, alpacas y camellos) (Tanco *et al.*, 2012, Druart *et al.*, 2013, Bogle *et al.*, 2018), relacionándose con la inducción de la ovulación.

Por último, el efecto del β -NGF en la calidad de los **espermatozoides** se ha determinado en algunos estudios *in vitro* en los que difiere principalmente la dosis añadida en el semen. En el hámster dorado se observó que, a unas concentraciones de entre 10 y 500 ng/ml, aumentaba la motilidad y la velocidad rectilínea a través de la vía MAPK (Jin *et al.*, 2010). En bovinos, a concentraciones de 5 a 80 ng/ml, el β -NGF exógeno produce un aumento en la viabilidad espermática, aunque no tiene efecto en la actividad mitocondrial ni en la capacitación del espermatozoide (Li *et al.*, 2010b). Por otro lado, en humanos se ha demostrado un efecto positivo dosis-dependiente en la motilidad espermática en individuos sanos (Shi *et al.*, 2012, Lin *et al.*, 2015), con una disminución de la apoptosis y un aumento de la viabilidad tras el proceso de criopreservación (Saeednia *et al.*, 2015), mientras que en individuos con problemas de motilidad (astenozoospermia, reducción de la motilidad espermática) el β -NGF tiene efecto protector en muestras criopreservadas sólo cuando se añade a bajas dosis (0,5 ng/ml) (Saeednia *et al.*, 2016).

El sistema β -NGF en el conejo

En los últimos años, se ha estudiado en gran medida el sistema β -NGF en el aparato reproductor de conejos, por tratarse de una especie de ovulación inducida, al igual que los camélidos, en los que se ha demostrado el importante papel que juega en la reproducción.

El primer órgano masculino de conejos que se descubrió donde el β -NGF era muy abundante fue la próstata (Harper and Thoenen, 1980). Décadas más tarde, Maranesi y colaboradores (2015), estudiaron de nuevo este órgano y mostraron que β -NGF está presente junto con sus receptores en las células epiteliales glandulares y en las células del estroma. Igualmente, se ha descrito la expresión génica y la presencia de la proteína y sus dos receptores en los testículos (Maranesi *et al.*, 2015, García-García *et al.*, 2018), distribuyéndose en las células de Sertoli, células de Leydig y células germinales de diferentes estadios (espermatogonias, espermatoцитos y espermátida). Estos hallazgos

sugieren que el β -NGF participa en el desarrollo testicular y en la espermatogénesis, así como en la regulación de los procesos de crecimiento y diferenciación tisular en los conejos como en otras especies, mediante mecanismos autocrinos/paracrinos (Maranesi *et al.*, 2015). Finalmente, se ha descrito su expresión en las glándulas seminales de conejo, siendo menos abundante en la próstata y en los testículos (Maranesi *et al.*, 2015).

Por otro lado, el β -NGF también aparece en el PS del conejo aunque no está claro su papel. Los estudios sobre la concentración de β -NGF en el PS de conejo son dispares, ya que abarcan un rango muy amplio: desde aproximadamente 2 ng/ml (Maranesi *et al.*, 2015, Casares-Crespo *et al.*, 2018a) hasta 15×10^4 ng/ml (Maranesi *et al.*, 2018). Según los estudios proteómicos más recientes, el β -NGF es independiente de la línea genética (Casares-Crespo *et al.* 2018b) y está en una baja proporción (1,4%) en comparación con los camélidos, en los que representa desde un 25 a un 50% de la proteína total del eyaculado (25% en camellos, 47% en alpacas) (Druart *et al.*, 2013). Por ello, se ha postulado que el β -NGF en conejos ejerce otras funciones diferentes a otras especies de ovulación inducida (Casares-Crespo *et al.*, 2018a), como puede ser el aumento de la calidad de los cuerpos lúteos (CL) que se observa en vacas (Stewart *et al.*, 2018). Sin embargo, se necesitan estudios más específicos para valorar el papel del β -NGF presente en el PS de los conejos.

1.4. EL SISTEMA β -NGF EN LA REPRODUCCIÓN DE LA HEMBRA

El sistema β -NGF ha sido muy estudiado en la hembra. Se muestra una breve recopilación bibliográfica en la tabla 1.3.

La presencia del sistema β -NGF en todos los órganos recogidos en la tabla 1.3 pone de manifiesto la importancia que ejerce este factor de crecimiento en la fisiología reproductiva femenina. Uno de los papeles fundamentales del β -NGF que se ha descubierto en hembras de ovulación inducida ha sido su participación en el proceso de la ovulación, regulado por un control hormonal exhaustivo, donde juegan un papel clave la LH y la FSH, entre otras hormonas.

Tabla 1.3. *Especies donde se han encontrado β -NGF y/o sus receptores (TrkA y p75) en diferentes órganos sexuales femeninos.*

Especie	Tejido	β -NGF	TrkA	p75	Referencia bibliográfica
Humano	Placenta	✓	✗	✗	Goldstein <i>et al</i> 1978, Bigon <i>et al</i> 1990
Humano	Ovario	✓	✓	✗	Salas <i>et al.</i> , 2006
Rata	Ovario	✓	✗	✗	Lara <i>et al.</i> , 1990
Rata	Ovario	✗	✓	✓	Dissen <i>et al.</i> , 1991
Rata	Ovario	✓	✓	✓	Dissen <i>et al</i> 1995
Rata	Útero, Cérvix	✓	✗	✗	Varol <i>et al</i> 2000
Rata	Útero	✓	✗	✗	Lobos <i>et al</i> 2005
Primate	Ovario	✓	✗	✗	Dees <i>et al</i> 1995
Cobaya	Útero, Cérvix, Final del cuerno	✓	✗	✗	Brauer <i>et al.</i> , 2000
Ratón	Ovario	✓	✗	✗	Dissen <i>et al</i> 2001, 2009
Ratón	Ovario	✓	✓	✓	Romero <i>et al</i> 2002
Cerda, Vaca	Ovario	✗	✓	✓	Levanti <i>et al</i> 2005
Hámster dorado	Ovario	✓	✓	✓	Weng <i>et al</i> 2008
Cerda	Ovario	✓	✓	✓	Jana <i>et al</i> 2011
Ardilla de tierra	Útero	✓	✓	✓	Li <i>et al</i> 2012
Ardilla de tierra	Ovario	✓	✓	✓	Li <i>et al</i> 2014, Bao <i>et al.</i> , 2014
Vaca	Oviducto	✓	✓	✗	Li <i>et al.</i> , 2014
Vaca	Ovario	✗	✓	✗	Carrasco <i>et al.</i> , 2016
Cabra	Ovario	✓	✗	✗	Naicy <i>et al</i> 2016
Codorniz	Ovario	✓	✓	✓	Maruccio <i>et al</i> 2018
Coneja	Útero	✓	✓	✓	Maranesi <i>et al</i> 2016
Coneja	Ovario, Cérvix	✓	✓	✓	Maranesi <i>et al</i> 2018
Coneja	Ovario, Útero, Oviducto	✓	✓	✓	García-García <i>et al</i> 2018b

A pesar de que en algunas especies de ovulación inducida se ha demostrado que la monta natural, acompañada de los estímulos olfativos y sensoriales, es suficiente para provocar un pico preovulatorio de LH (Bakker y Baum, 2000), en los últimos años se ha descubierto un factor inductor de la ovulación (OIF, por sus siglas en inglés *Ovulation-inducing factor*) presente en el PS, que produce la ovulación en ciertas especies, como los camélidos, tras su administración parenteral o intravaginal (Chen *et al.*, 1985; Adams *et al.*, 2005; Tanco *et al.*, 2011). Se ha demostrado que el PS administrado por vía intramuscular en alpacas (Adams *et al.*, 2005, Ratto *et al.*, 2005) y llamas (Adams *et al.*, 2005, Silva *et al.*, 2011a, Silva *et al.*, 2017a) produce la ovulación en más del 90% de las hembras testadas. Cuando el PS se administra por vía intrauterina, no da resultados tan exitosos, aunque aumenta cuando se realiza un curetaje de la mucosa uterina, lo que indica

que en los camélidos la respuesta ovulatoria al PS depende de la absorción del OIF en la mucosa (ya que la disrupción de la mucosa endometrial aumenta la absorción) hacia la circulación (vía sistémica), y por tanto no dependería de la estimulación mecánica de la monta natural (Ratto *et al.*, 2005, Adams *et al.*, 2016).

Recientemente, el OIF se ha identificado como el β -NGF en camélidos mediante estudios bioquímicos de purificación e identificación proteica del PS (Ratto *et al.*, 2012, Kershaw-Young *et al.*, 2012). La administración del OIF/NGF purificado de PS a diferentes concentraciones producen un efecto dosis-respuesta (Tanco *et al.*, 2011, Stuart *et al.*, 2015), siendo necesarias dosis mayores a nivel uterino para producir unas altas tasas de ovulación (Silva *et al.*, 2015). Asimismo, se ha demostrado que el OIF/NGF modula directa o indirectamente la LH secretada por la hipófisis por estimulación de la GnRH, ya que el uso de un antagonista de GnRH (cetorelix) supone la inhibición del pico preovulatorio de LH y la posterior ovulación en llamas tratadas con OIF/NGF (Silva *et al.*, 2011b). Esta modulación parece retrasar el pico de la LH y mantenerlo durante más tiempo, en comparación con el tratamiento con GnRH en llamas (Adams *et al.*, 2005, Tanco *et al.*, 2011, Ulloa-Leal *et al.*, 2014, Adams *et al.*, 2016).

Algunos estudios demuestran que el PS también tiene efecto sobre el CL y tiene capacidad esteroidogénica en los folículos *in vitro* (O'Leary *et al.*, 2006, Bromfield *et al.*, 2016). En este sentido, la administración del OIF/NGF produce un efecto luteotrófico en llamas (Silva *et al.*, 2014, Ulloa-Leal *et al.*, 2014, Fernández *et al.*, 2014, Silva *et al.*, 2017a, b), en alpacas (Stuart *et al.*, 2015) y en toros (Tanco *et al.*, 2012, Tribulo *et al.*, 2015, Stewart *et al.*, 2018), aumentando la vascularización y el diámetro del CL junto con la progesterona plasmática.

El sistema β -NGF en la coneja

El sistema β -NGF también se ha descrito en el tracto reproductor de conejas, lo que sugiere su participación en la fisiología reproductiva de éstas. Así, se ha localizado en el estroma y en las células endoteliales del cérvix (Maranesi *et al.*, 2018) y del útero (Maranesi *et al.*, 2016, García-García *et al.*, 2018b), y se ha determinado la concentración plasmática de β -NGF, que no se relaciona con la fase en la que se encuentre el ovario ni con el nivel de estrógenos circulantes (García-García *et al.*, 2018b). La presencia de β -NGF en las células uterinas sugiere su producción en estas, de tal manera que podría

actuar en el desarrollo o en la plasticidad de la innervación uterina a través de factores de supervivencia como p53. Asimismo, se ha demostrado mediante técnicas *in vitro* que el β -NGF produce la liberación de prostaglandinas (PG) en el útero, mediante la unión a sus dos receptores (Maranesi *et al.*, 2016). Cuando la neurotrofina se une a TrkA produce liberación de PG2 α y de PGE2, mientras que cuando se une a p75 se secreta únicamente PG2 α en menor medida que con la unión al otro receptor. La secreción de PG en el útero es de gran importancia en mamíferos ya que participa en la respuesta inflamatoria local uterina posterior a la cópula y en la luteolisis en el caso de no producirse la fecundación o al final del período de gestación (Boiti *et al.*, 2003). Este hallazgo evidencia, la participación del sistema β -NGF en la reproducción del conejo. También se ha detectado en **oviducto**, aunque de manera no muy abundante (Garcia-Garcia *et al.*, 2018b). Sin embargo, la presencia del sistema β -NGF en esta localización puede estar relacionada con la interacción con los gametos maduros o con efectos beneficiosos sobre el embrión en desarrollo, como se ha comprobado *in vitro* (Pei, 2010). En los **ovarios**, el β -NGF y su receptor de alta afinidad se encuentran en las células de la granulosa y de la teca (Garcia-Garcia *et al.*, 2018b, Maranesi *et al.*, 2018).

En los últimos años, se están llevando a cabo estudios para comprobar si en el conejo existe un OIF presente en el PS (Silva *et al.*, 2011, Maranesi *et al.*, 2018, Garcia-Garcia *et al.*, 2018a), como se ha demostrado en los camélidos. A pesar de la presencia de la proteína y sus receptores en el tracto reproductor de los conejos y en el PS, no se ha podido demostrar la existencia de un factor inductor de la ovulación en esta especie. Las investigaciones con la administración intramuscular de PS de conejo o de llama (Silva *et al.*, 2011) y con β -NGF de origen murino (García-García *et al.*, 2018) no han concluido que se provoque la ovulación en las conejas, aunque se aumenta el número de folículos hemorrágicos que no han sufrido correctamente la luteinización y no han sido capaces de ovular en las conejas tratadas con β -NGF en comparación con las tratadas con GnRH. La hipótesis es que es posible que no se haya provocado la respuesta ovulatoria porque la especificidad de especie del β -NGF utilizado o porque la dosis o la vía sean inadecuadas. En este sentido, se está estudiando la vía intravaginal para la administración de análogos de GnRH con el fin de la inducción de la ovulación (Quintela *et al.*, 2004, Viudes-de-Castro *et al.*, 2007, Rebollar *et al.*, 2012, Dal Bosco *et al.*, 2014). El éxito de esta vía se basa en que la mucosa vaginal presenta unas características anatómicas y funcionales que

favorecen la absorción de moléculas que son administradas por vía vaginal (Dal Bosco *et al.*, 2011), que son las siguientes:

1. Un epitelio columnar monoestratificado, que le confiere un grosor pequeño.
2. Un mucus vaginal, que presenta un bajo volumen durante el celo y cuya composición y viscosidad favorecen la absorción de péptidos pequeños altamente solubles en agua.
3. Una flora vaginal reducida.
4. Una vascularización vaginal presente en la lámina propia uretro-vaginal y unas conexiones vasculares abundantes entre la vagina y el útero. Además, la anastomosis de las arterias uterinas y ováricas a nivel del oviducto, facilita la llegada de moléculas administradas por vía intravaginal al ovario.
5. Una innervación uterina con neuronas motoras y sensitivas simpáticas y parasimpáticas, que controlan la función contráctil uterina.

El estímulo somatosensorial juega un papel importante en esta especie en la inducción de la ovulación. De hecho, la estimulación vaginal con una varilla de vidrio o un catéter de inseminación puede provocar la ovulación de un número elevado de animales (40-45%: Sawyer *et al.*, 1959; 37.5%: Rebollar *et al.*, 2012). Sin embargo, este estímulo mecánico no es suficiente para inducir la ovulación en un 100% de las conejas y la respuesta individual es muy variable. Por ello, en las granjas de producción cunícola es necesario la administración de un análogo de GnRH después de la inseminación artificial (IA).

Un estudio reciente publicado por Maranesi *et al.* (2018) plantea una nueva hipótesis sobre las vías de actuación del β -NGF en la reproducción de las conejas nulíparas, según los estudios realizados con semen puro, en el que proponen que el β -NGF procedente del PS y de la síntesis de las células uterinas actúa por vía endocrina en los ovarios y por vía neuronal, a través de los receptores de fibras nerviosas locales, en los centros hipotálamicos, para producir el pico de LH y la posterior ovulación.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El papel del factor de crecimiento nervioso, β -NGF, parece ser importante en la reproducción ya que interviene en los procesos de maduración y desarrollo del tracto reproductor masculino y en la espermatogénesis en el macho, así como en los procesos de maduración de los ovocitos y ovulación, en las hembras. Igualmente, cuando se adiciona de forma exógena influye sobre los parámetros de calidad del eyaculado de algunas especies (humano, toro y hámster) y participa en el desarrollo embrionario en condiciones *in vitro*. Asimismo, se ha descrito su función como factor inductor de la ovulación (OIF) en algunas especies de ovulación inducida, como los camélidos.

En el conejo, se ha estudiado la expresión del sistema β -NGF en algunos órganos del aparato reproductor del macho adulto (testículos, próstata y glándula seminal) y en el plasma seminal (PS), lo que hace suponer la relevancia de este factor en la fisiología de la reproducción de esta especie. Sin embargo, no se ha determinado si existen variaciones en el sistema β -NGF en el proceso de maduración sexual en el conejo ni si presenta una relación con el nivel de andrógenos.

Por otro lado, en vista de la presencia de β -NGF en el PS de conejos y de que las conejas son animales de ovulación inducida, al igual que los camélidos, se ha sugerido que este factor también puede ser capaz de inducir la ovulación en las hembras de esta especie. En estudios previos, no se ha conseguido una respuesta ovulatoria óptima tras la administración parenteral de PS de conejo o β -NGF de origen murino, pero sí un aumento de la cantidad de folículos hemorrágicos que no fueron capaces de ovular, lo que conduce a pensar que la dosis y la especificidad de la proteína son importantes para conseguir una respuesta ovulatoria adecuada. Por ello, el uso de una proteína recombinante homóloga permitiría comprobar si el β -NGF es capaz de producir la ovulación en conejas. En este caso, la aplicación de este factor de crecimiento por vía intravaginal en la dosis de inseminación sería muy relevante para optimizar los protocolos de inseminación en las granjas de conejos. En este sentido, en los últimos años se están desarrollando investigaciones en estas granjas para mejorar los métodos utilizados en la reproducción de la explotación destinados a inducir la ovulación, evitando la administración parenteral de hormonas (análogos sintéticos de la GnRH) mediante la adición de moléculas inductoras de la ovulación en la dosis seminal.

Por todo ello, los objetivos de la presente tesis doctoral han sido:

- Objetivo 1: Caracterizar el sistema β -NGF en el aparato reproductor masculino de conejos durante la madurez sexual y relacionar los niveles de β -NGF plasmáticos y del plasma seminal con el nivel de testosterona plasmática.
- Objetivo 2: Producir β -NGF recombinante de conejo y realizar ensayos de su funcionalidad biológica en células PC12 y espermatozoides de conejo. Comparar la secuencia proteica del NGF de conejo con especies de ovulación inducida y espontánea.
- Objetivo 3: Valorar la adición de diferentes concentraciones de β -NGF recombinante de conejo *in vitro* en la dosis de inseminación e *in vivo* en conejas por vía intravaginal para comprobar la inducción de la ovulación.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DISEÑOS EXPERIMENTALES

3.1.1. Caracterización del sistema β -NGF en el macho

3.1.1.1. Estudio de la expresión génica e inmunolocalización de β -NGF y sus dos receptores (TrkA y p75) en el tracto reproductor masculino de conejo durante la madurez sexual.

Los conejos incluidos en este experimento comenzaron su periodo de entrenamiento de salto en vagina artificial a las 20 semanas de acuerdo con lo descrito en la bibliografía (Viudes-de-Castro *et al.*, 2015). Los machos estaban sometidos a un ritmo de extracción extensivo, realizando dos saltos en un mismo día, separados entre sí aproximadamente 20-30 minutos (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2015). Este ritmo de recogida semanal se siguió durante todo el experimento para mantener la actividad sexual y la calidad del semen, como se puede observar en la figura 3.1.

Se recogieron muestras de semen, plasma seminal (PS), sangre y tejidos a las 22 semanas de edad (inicio de la madurez sexual) y a las 37 semanas (final de madurez sexual) de 6 machos de acuerdo con Timón (2018) (Fig. 3.1).

La muestra de semen estaba constituida por la unión de los dos eyaculados de un mismo macho en el día; de cada edad se recogieron 3 muestras, con una separación entre ellas de 2 días de manera que se obtuvieron 6 muestras por macho en cada una de las edades. Se analizaron al microscopio óptico y con el analizador computerizado de semen (CASA).

Por otro lado, para la muestra de tejidos, los conejos se sacrificaron mediante dislocación cervical y se realizó la disección de la cavidad pélvica y abdominal. Se disecaron la próstata, las glándulas bulbouretrales y la cabeza y cola del epidídimo de 4 animales por edad, los cuales fueron distribuidos para los experimentos relacionados con la expresión génica y para los de inmunohistoquímica. Para los primeros, se dispusieron porciones de 2-5 mm aproximadamente de cada tejido en tubos con la solución RNAlater (RNAlater® stabilization solution, Ambion, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) para evitar la degradación del ARN de la muestra. Tras permanecer toda la noche a 4° C, el RNAlater se eliminó y los tejidos se almacenaron a -80° C hasta la extracción del ARN. Para los estudios de inmunohistoquímica, los tejidos se fijaron en fluido de Davidson modificado (12% formaldehído, 15% etanol, 5% ácido acético glacial en agua destilada, Panreac) durante 24 h, tras lo cual se lavaron en PBS durante 30 min para eliminar los restos del

fijador, y se mantuvieron en etanol 70% hasta que se incluyeron en bloques de parafina. Se realizaron cortes seriados de 5 μ m con un micrótomo en el Servicio de Histología del Centro Nacional de Biotecnología (CNB, CSIC).

3.1.1.2. Estudio de la relación de los niveles de β -NGF plasmáticos y del PS con los niveles de testosterona plasmática

Se separó el PS de las muestras de semen en cada uno de los puntos de estudio (22 y 37 semanas) y se analizó la presencia de β -NGF mediante Western blot (WB) que se cuantificó de forma relativa con respecto a β -actina (ratio β -NGF/ β -actina). Este procedimiento se repitió 3 veces. Asimismo, se determinó por duplicado la concentración de β -NGF mediante la técnica de ELISA. También se recogió sangre y se procesó para la obtención de plasma sanguíneo con el fin de analizar la concentración de β -NGF y testosterona mediante ELISA, también por duplicado.

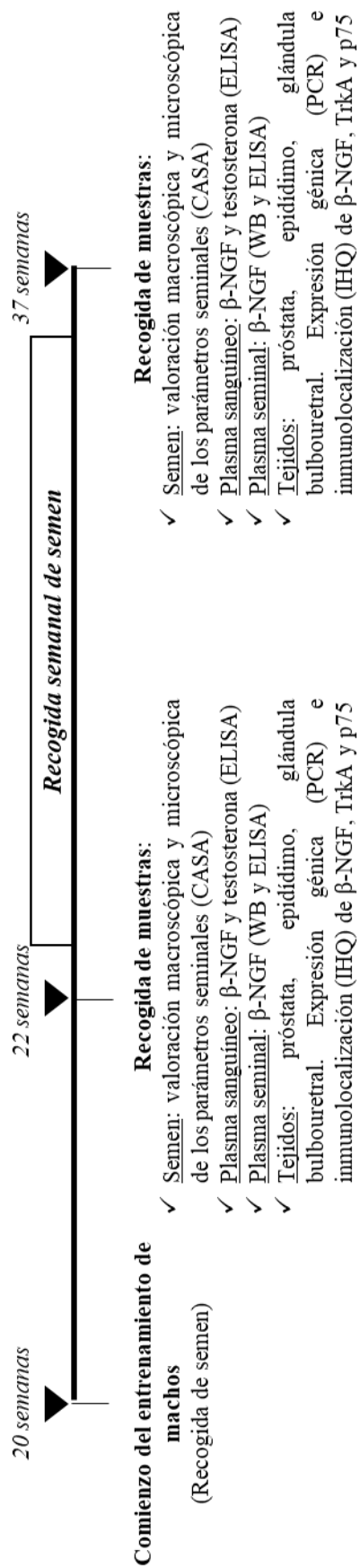


Figura 3.1. *Diseño experimental del objetivo 1.*

3.1.2. Producción y caracterización del β -NGF recombinante de conejo

3.1.2.1. Secuenciación y producción de β -NGF recombinante de próstata de conejo

Para la producción de la proteína recombinante fue necesario, en primer lugar, determinar la secuencia genética del NGF procedente de la próstata de conejo, puesto que no se encontraba descrita en GenBank. Para ello, se diseccionó la próstata de 3 conejos adultos y se recogió el tejido según lo descrito en el apartado anterior para la toma de muestras para expresión génica y se utilizó la técnica RACE para la secuenciación del gen completo. Una vez secuenciado, se introdujo en el plásmido pD2539-CEF (DNA 2.0) que contiene genes de resistencia a kanamicina y puromicina. Se produjo en grandes cantidades en células bacterianas competentes y posteriormente se transfectó en células de ovario de hámster chino (CHO). Seguidamente, se purificó mediante columnas de níquel, se detectó mediante WB y se analizó la huella peptídica mediante el análisis de espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF), como se ha descrito en nuestros estudios previos (García-García *et al.*, 2018a). Finalmente, el efecto biológico de la proteína recombinante resultante se analizó mediante ensayos experimentales en células de feocromocitoma de médula adrenal de rata (PC12) en las que se valoró su viabilidad, el grado de diferenciación a células tipo neurona, la unión específica al anticuerpo anti- β -III tubulina y su inhibición tras el bloqueo con un inhibidor específico del receptor TrkA según se muestra en la Fig. 3.2. En cada experimento se testó cada concentración por triplicado y se realizaron 3 replicados del experimento.

3.1.2.2. Estudio de la secuencia proteica de NGF y comparación con especies de ovulación inducida y espontánea

Se estudió la secuencia proteica de NGF secuenciado de conejo en comparación con el NGF de varias especies de ovulación inducida y de ovulación espontánea utilizando los programas de bioinformática Clustal Omega y Serial Cloner 2.6, y determinando las diferencias en los sitios de unión a los receptores.

3.1.2.3. Efecto de la adición del β -NGF recombinante sobre el semen puro de conejo

Para la determinación de los efectos de la proteína recombinante sobre los espermatozoides de conejo, se utilizaron 6 machos reproductores adultos, a los que se extraía semen semanalmente de manera rutinaria. La muestra, por tanto, se compuso de un *pool* de eyaculados de 6 machos, a los cuales se administraron diferentes concentraciones de proteína recombinante homóloga (0, 2, 20 y 100 ng/ml) y se analizaron los parámetros seminales mediante el CASA a las 0, 1 y 2 horas después de la adición del factor. Se realizaron 3 replicados del experimento. El diseño experimental de este estudio se muestra en la figura 3.3.

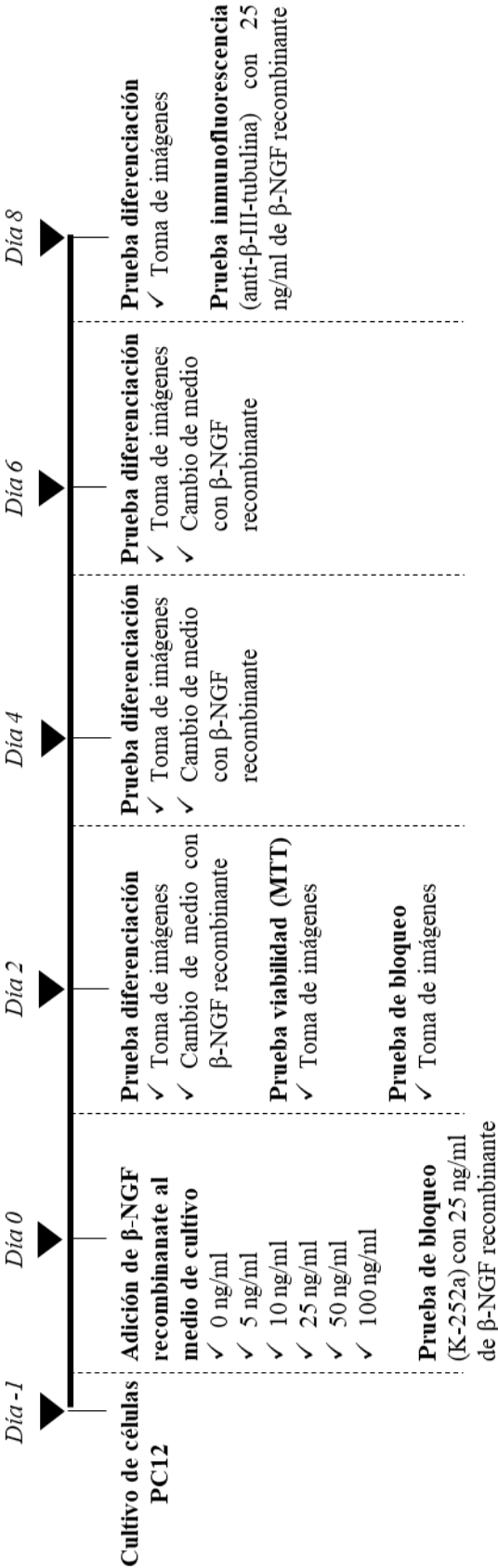


Figura 3.2. *Diseño experimental del estudio dosis-respuesta con diferentes concentraciones (0, 5, 10, 25, 50 y 100 ng/ml) de β -NGF recombinante en células PC12.*

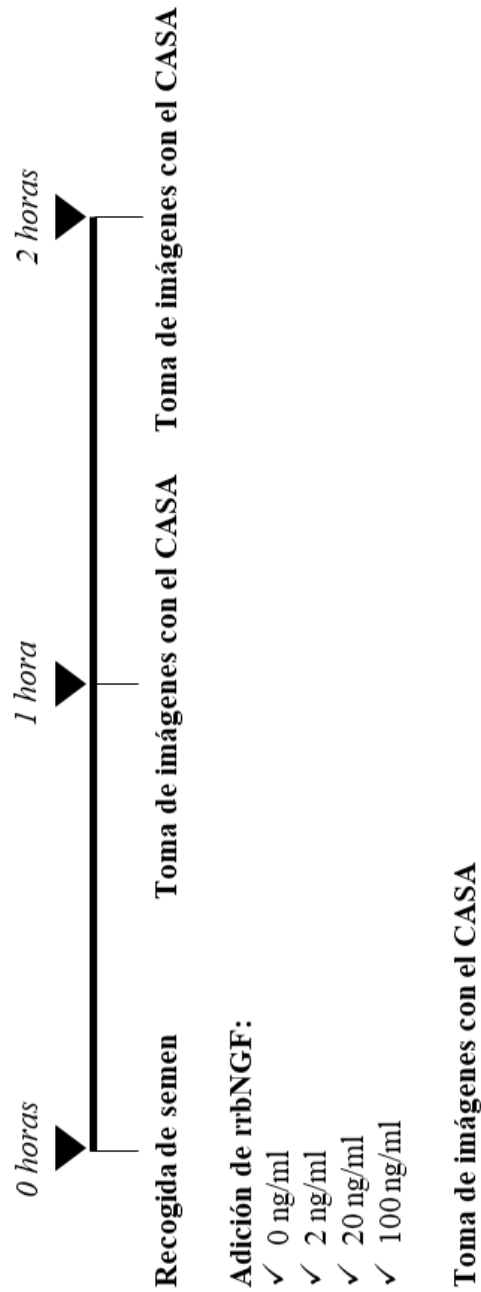


Figura 3.3. *Diseño experimental del efecto de diferentes concentraciones (0, 2, 20 y 100 ng/ml) de β -NGF recombinante sobre el semen puro de conejo a las 0, 1 y 2 horas tras su adición.*

3.1.3. Ensayos *in vitro* e *in vivo* con el β -NGF recombinante

3.1.3.1. Efecto de la adición del β -NGF recombinante en la dosis seminal

Se realizó un estudio dosis-respuesta en el semen diluido (n=6 machos) según la dosis de inseminación artificial (IA), empleando diferentes concentraciones de β -NGF recombinante (de acuerdo con los niveles de β -NGF en PS de conejo descritos en la bibliografía): 0, 20 ng/ml, 100 ng/ml, 1 μ g/ml, 20 μ g/ml y 100 μ g/ml. Se realizaron 3 replicados de estos análisis.

3.1.3.2. Inducción de la ovulación en conejas mediante el β -NGF recombinante de conejo administrado por vía intravaginal en la dosis seminal

Para realizar la IA, se emplearon las mismas concentraciones de β -NGF recombinante que las utilizadas en el experimento anterior. Un total de 62 conejas receptoras se utilizaron para este estudio y se distribuyeron de la siguiente manera: grupo 20 ng/ml (n=10), grupo 100 ng/ml (n=10), grupo 1 μ g/ml (n=10), grupo 20 μ g/ml (n=7) y grupo 100 μ g/ml (n=7) (Fig. 3.4). El grupo control positivo fueron hembras que recibieron GnRH intramuscular (n=10) y el grupo control negativo lo constituyeron hembras inseminadas con el catéter vacío (n=8) para simular el estímulo mecánico. Se recogió sangre de todas las conejas a los 0, 30, 60 y 120 min post-IA para estudiar el pico de LH y también en los días 0 y 7 post-IA para analizar los niveles de progesterona plasmática. Las concentraciones de LH y progesterona se analizaron mediante técnicas de ELISA.

En el día 7 post-IA se sacrificaron las conejas y se extrajo el aparato reproductor para la visualización de los ovarios y de las vesículas embrionarias en los cuernos uterinos (Fig. 3.5). Los datos que se recogieron fueron: tasa de ovulación (porcentaje de hembras ovuladas frente al número de hembras tratadas), número de CL, número total de folículos hemorrágicos (FH, folículos anovulatorios rellenos de sangre) y número de folículos preantrales (mayores de 1 mm).

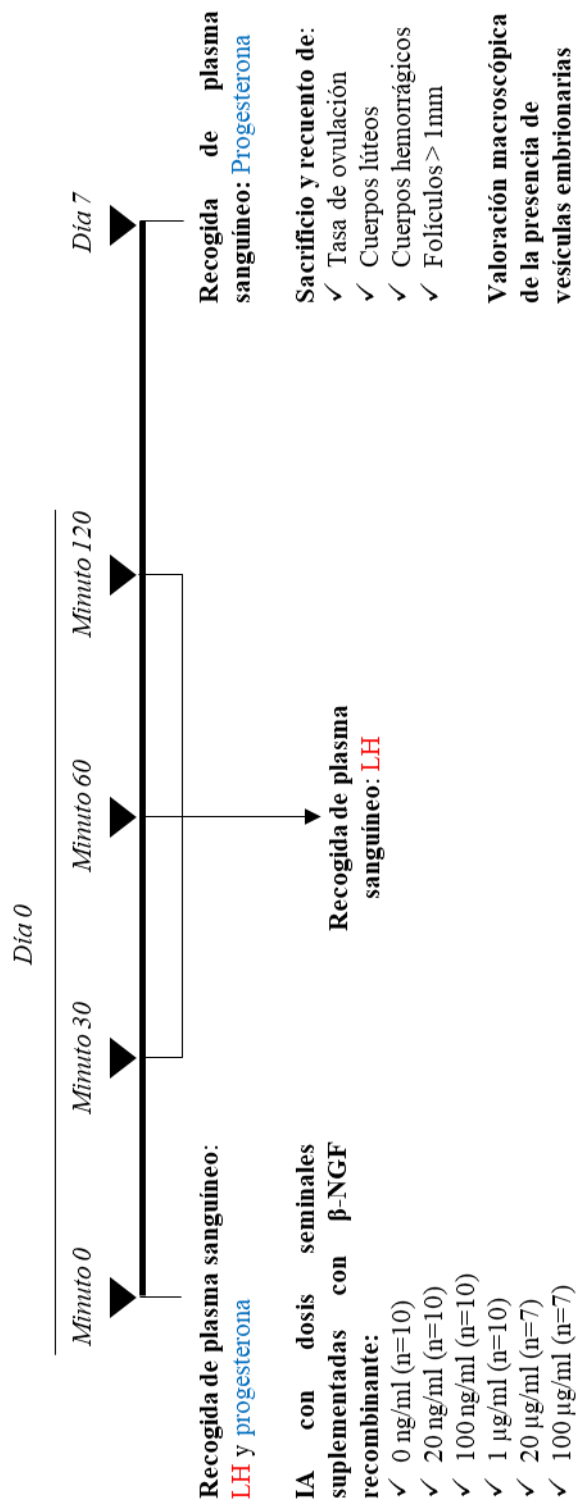


Figura 3.4. Diseño experimental de la prueba in vivo de conejas con administración intravaginal de diferentes concentraciones (0, 20 ng/ml, 100 ng/ml, 20 μ g/ml, 1 μ g/ml y 100 μ g/ml) de β -NGF recombinante en la dosis seminal.

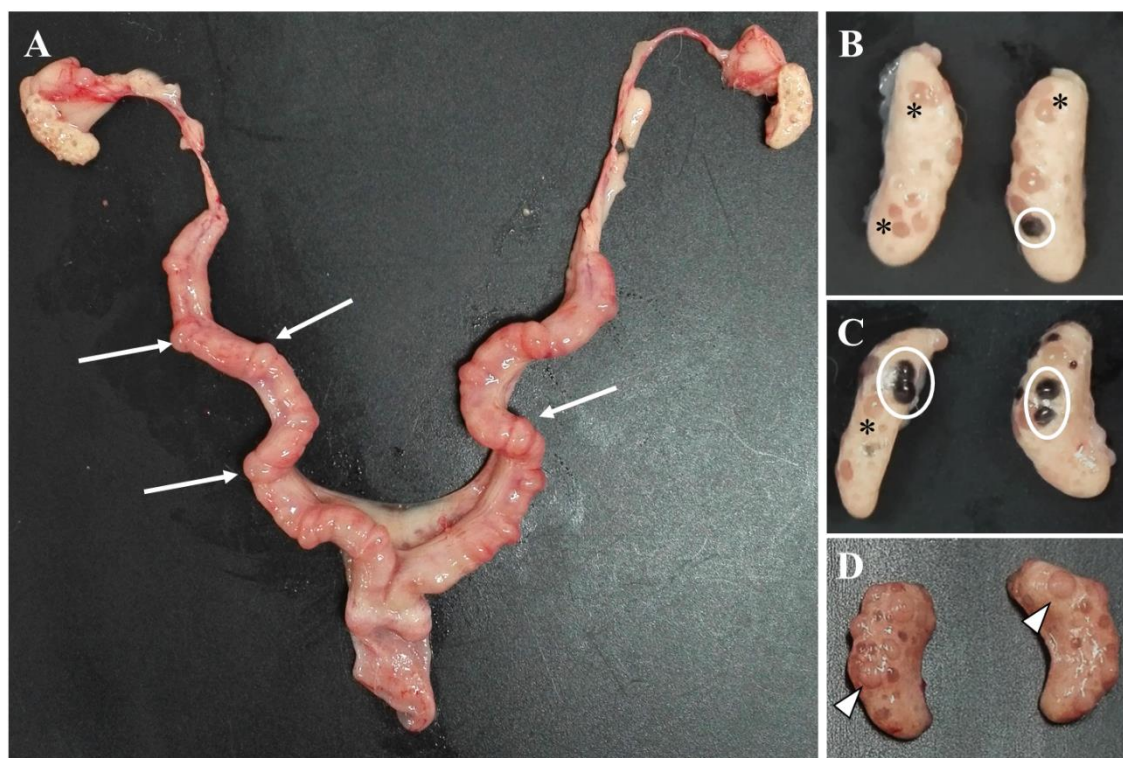


Figura 3.5. Visualización macroscópica del tracto reproductor femenino (A) y ovarios (B-D). A) Las flechas blancas marcan las vesículas embrionarias. B y C) Ovarios sin ovulaciones y con folículos preantrales (*) y folículos hemorrágicos (círculo blanco). D) Ovario con cuerpos lúteos (cabeza de flecha blanca). Fuente propia.

3.2. ANIMALES E INSTALACIONES

Para la realización de los experimentos se utilizaron conejos (*Oryctolagus cuniculus*) híbridos del cruce Neozelandés blanco x California. Los animales se alojaron en la granja experimental del Departamento de Producción Agraria de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas (ETSIAAB) de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM) en jaulas individuales de 700 mm x 500 mm x 320 mm con acceso a comida y agua *ad libitum* (Fig. 3.6). Se mantuvieron en condiciones controladas de fotoperiodo (16 h de luz y 8 h de oscuridad), temperatura (20-25 °C) y humedad relativa (60-75%). Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética del Departamento de Producción Agraria de la ETSIAAB (UPM), y se realizaron conforme al RD53/2013, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.



Figura 3.6. A) Nave de conejos de los Campos de prácticas de la ETSIAAB (UPM). B) Macho en jaula individual. Fuente propia.

3.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

3.3.1. Recogida de semen y PS. Análisis de las características seminales

La recogida de semen se realizó mediante vagina artificial a una temperatura y presión cercanas a las fisiológicas y con ayuda de una coneja receptiva como maniquí (Fig. 3.7). Una vez extraído el semen, se procedía a eliminar el gel y valorar el volumen y las características macroscópicas del eyaculado (color y presencia de sedimento). Sólo eran considerados como válidos para los experimentos aquellos eyaculados con un color blanco nacarado, ausencia de sedimento y un volumen mayor de 0,1 ml. Tras ello, se juntaban los eyaculados según el experimento realizado, y se valoraba en cada muestra la motilidad en masa del 1 al 4 en un microscopio óptico a 20x, siendo 1 cuando no se observaba movimiento de los espermatozoides y 4 cuando el movimiento en ondas era máximo (Ambriz *et al.*, 2002). Seguidamente, se recogían dos alícuotas de cada eyaculado, una para calcular la concentración espermática en una cámara de Neubauer y la integridad acrosómica tras su fijación con 2,5% de glutaraldehído, y otra que se utilizaba para valorar la viabilidad espermática y el porcentaje de formas anormales con la tinción de nigrosina.

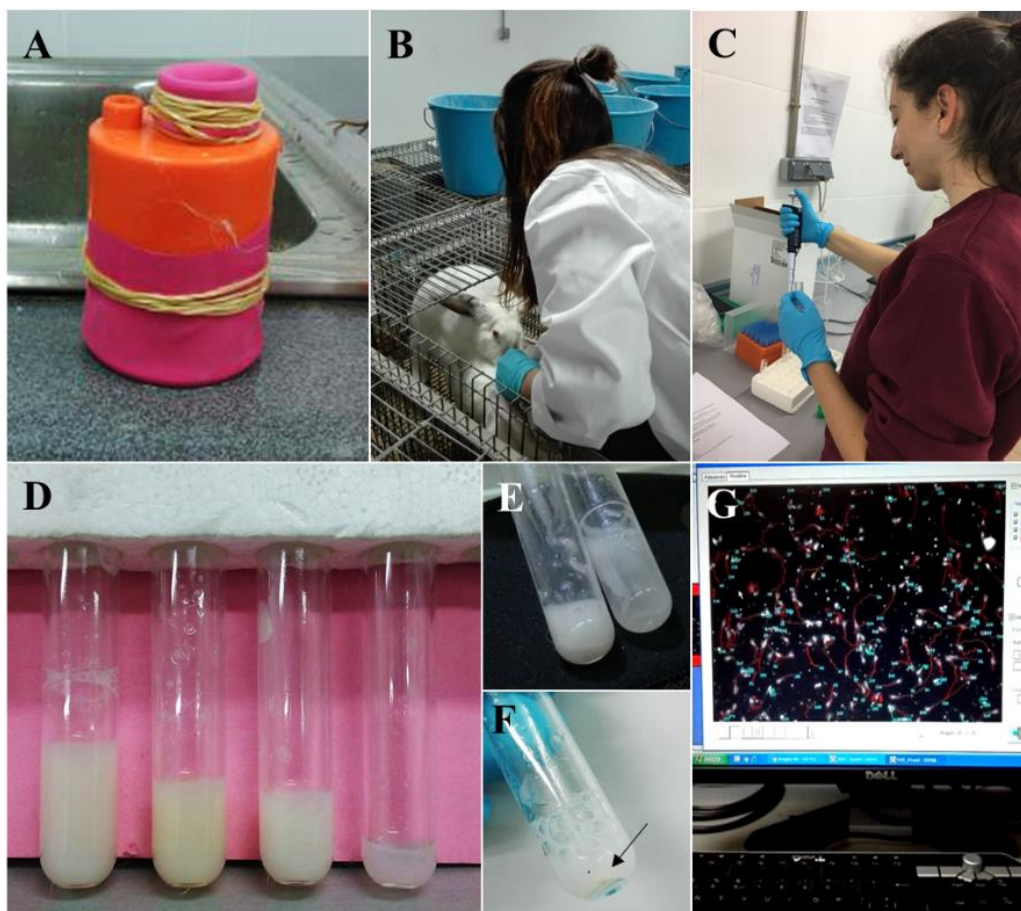


Figura 3.7. Procedimiento de recogida y análisis de semen: A) Vagina artificial. B) Extracción del semen. C) Manipulación del semen en el laboratorio de la granja. D) Eyaculados de conejo con diferente color y volumen. E) Eyaculado sin gel (izquierda) y con gel (derecha). F) Presencia de sedimento (flecha). G) Análisis computerizado de semen con el CASA. Fuente propia.

Posteriormente, en un tiempo máximo de 1 h tras la recogida, se evaluaban los parámetros de motilidad y velocidad mediante un analizador computerizado de semen (CASA, por sus siglas en inglés), utilizando el módulo *Motility* de Sperm Class Analyzer (SCA®) versión 5.2 (Microptic S.L.). Para grabar las imágenes de cada muestra, se dispensaban 5-7 μ l de semen diluido en un porta-objetos atemperado y se registraban en el programa de 5 a 10 campos de espermatozoides para analizar al menos 200 células por muestra. Los parámetros analizados fueron la motilidad total (MOT, %), la motilidad progresiva (PMOT,%), el porcentaje de espermatozoides estáticos (STAT, %), la velocidad curvilínea (promedio de la velocidad de la cabeza espermática a través de su trayectoria

real, VCL, $\mu\text{m/s}$), la velocidad rectilínea (promedio de la velocidad de la cabeza

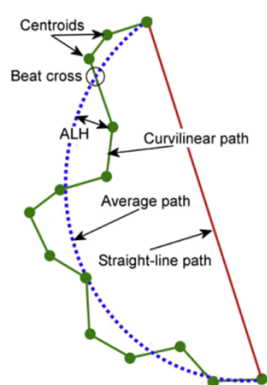


Figura 3.8. Parámetros analizados mediante el CASA. Beat cross=BCF; Curvilinear path=VCL; Average path=VAP; Straight-line path=VSL. Imagen de Amann y Waberski, 2014.

espermática a través de la línea recta que une la primera posición de la trayectoria con la última, VSL, $\mu\text{m/s}$), la velocidad media de la trayectoria (promedio de la velocidad de la cabeza espermática a través de su trayectoria promedio, VAP, $\mu\text{m/s}$), el desplazamiento lateral de la cabeza espermática (amplitud de las variaciones de la trayectoria actual de la cabeza espermática en su relación con la VAP, ALH, μm), la linealidad (refleja la rectitud de la trayectoria espermática, LIN, %), la rectilinearidad (refleja la rectitud del movimiento, STR, %), el porcentaje de balanceo (grado de oscilación de la trayectoria real de la cabeza espermática en su relación con la VAP, WOB, %) y la frecuencia de golpe

cruzado (tasa promedio por la cual la trayectoria actual espermática cruza la VAP, BCF, Hz) (parámetros representados en la figura 3.8, de Amann y Waberski, 2014).

Para la recogida del PS se realizó una dilución 1:2 (v:v) del semen con tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) y se centrifugó a 3000 x g durante 30 min a 4°C (Allegra X-30R Centrifuge, Beckman Coulter), según García-García *et al.* (2018a). Una vez centrifugado, se comprobó con el microscopio óptico que el sobrenadante no contenía células espermáticas y se alicuotó para su almacenamiento a -20° C hasta el momento de la realización de los análisis experimentales.

3.3.2. Western blot (WB)

Se utilizó WB para la detección de β -NGF en PS y para detectar la proteína recombinante producida.

En el caso del PS, en primer lugar, se midió la proteína total siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976) con un *kit* comercial (Bradford Assay Kit, Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, 50 μg de proteína total del PS o 20 μl de β -NGF recombinante purificado se desnaturalizaron con *buffer* de carga (0,312 M Tris-HCl, 10% SDS, 25% 2-mercaptoetanol, 0,01% azul de bromofenol, 50% glicerol) durante 5 min a 95° C. Se realizó una electroforesis de las muestras en geles de poliacrilamida-SDS al 12% (12% SDS-PAGE) durante 2 h a 90 V (Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell,

Bio-Rad). Las proteínas presentes en los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (AmershamTM HybondTM ECL, GE Healthcare) en tanques de transferencia durante 80 min a un amperaje constante de 80 mA por gel. Posteriormente, las membranas de bloquearon en *buffer* de bloqueo (Odyssey® Blocking Buffer, LI-COR Biosciences) durante 1 h a temperatura ambiente y se incubaron toda la noche a 4° C con el anticuerpo primario anti- β -NGF hecho en cabra (0,1 μ g/ mL, N8773, Sigma-Aldrich) diluido en *buffer* de bloqueo con 0,1% de Tween 20. En el caso del PS también se incubó con anti- β -actina monoclonal de ratón (1 μ g/ mL, A2228, Sigma Aldrich). Tras varios lavados con PBS-Tween 20 al 0,1%, se añadió el anticuerpo secundario [IRDye® 800CW donkey anti-goat IgG (H + L) para β -NGF y IRDye® 680CW goat anti-mouse IgG (H + L) para β -actina, LI-COR Biosciences] durante 1 h a temperatura ambiente. Tras varios lavados con PBS, las membranas se visualizaron con un escáner de fluorescencia Odyssey (LI-COR Bioscience).

3.3.3. Extracción de sangre y preparación de plasma sanguíneo

Las muestras de sangre se obtuvieron de la arteria central de la oreja de los conejos inmovilizados mediante cepos (Fig. 3.9). Se recogieron en tubos con EDTA y se centrifugaron a 700 x g durante 15 min a 4° C para obtener el plasma sanguíneo. Las alícuotas se guardaron a -20° C hasta que fueron analizadas según el experimento correspondiente.



Figura 3.9. Conejos inmovilizados con cepos para la extracción sanguínea de la oreja. Fuente propia.

3.3.4. Enzimoinmunoensayo (ELISA)

La técnica de ELISA se utilizó para valorar los niveles de β -NGF y testosterona en plasma sanguíneo de machos y β -NGF en PS y para medir la concentración de LH y progesterona en plasma sanguíneo de hembras. En todos los casos, todas las muestras y los estándares se hicieron por duplicado y la concentración se analizó por extrapolación de las absorbancias en la curva estándar tras obtener una curva sigmoidea logística de 4 parámetros con el software Sigma Plot.

Para determinar la concentración de **β -NGF en plasma sanguíneo y PS** se utilizó un ELISA tipo sándwich específico de conejo (abx259154, Rabbit β -NGF ELISA kit, Abbexa). En este tipo de ELISA, la placa se encuentra tapizada por el anticuerpo anti-antígeno (anti- β -NGF), al cual se une de manera específica el β -NGF contenido en las muestras. Tras ello, se añade un segundo anticuerpo anti- β -NGF marcado con biotina, que se conjuga con la estreptavidina-HRP. El cromógeno TMB es el sustrato de la enzima HRP que produce un cambio de color de azul a amarillo tras la adición de la solución de frenado.

En nuestros experimentos, el plasma sanguíneo se testó sin diluir, mientras que el PS se diluyó 1:2 en PBS, de tal manera que la dilución final del PS fue 1:4 (v:v), ya que se había diluido previamente para su separación de las células espermáticas. Se siguieron las instrucciones provistas por el *kit*. Brevemente, tras dos lavados de placa, se dispensaron 100 μ l de las soluciones estándar y las muestras en los pocillos correspondientes y se incubó durante 90 min a 37° C para permitir la unión del β -NGF de las muestras a la placa. Seguidamente, se añadieron 100 μ l de anticuerpo conjugado con biotina y se incubó la placa 60 min a 37° C. Después de varios lavados, se realizó una incubación de 30 min a 37° C con el conjugado estreptavidina-HRP. Posteriormente, se lavó 5 veces la placa y se añadió el sustrato TMB durante 20 min a 37° C, que produjo un color azulado con una intensidad directamente proporcional a la cantidad de β -NGF presente en la muestra. Al añadir la solución de frenado el color viró a amarillo (Fig. 3.10). Las absorbancias se midieron a 450 nm con un espectrofotómetro (Bench Marck Plus Microplate Spectrophotometer System, Bio-Rad). Las variaciones intra- e inter-ensayo fueron CV<8% y CV<10%, respectivamente.

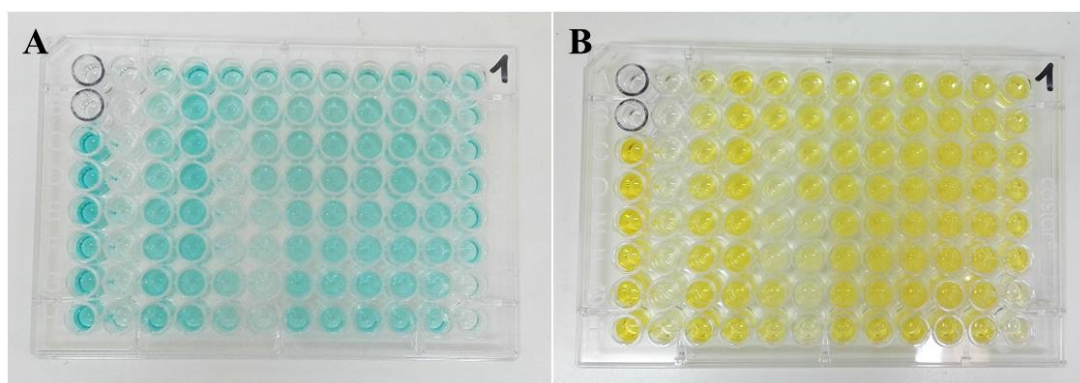


Figura 3.10. Placas de ELISA antes (A) y después (B) de añadir la solución de frenado. Fuente propia.

La **testosterona en el plasma sanguíneo** se midió con un ELISA de competición mediante un *kit* específico (DE1559, Demeditec Testosterone ELISA, Demeditec), en el que los pocillos se encuentran tapizados por un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce un sitio antigénico específico de la molécula de testosterona. La testosterona presente en las muestras compite con un conjugado de HRP y testosterona, de tal manera que, cuando se añade el cromógeno, la coloración azul que aparece es inversamente proporcional a la cantidad de testosterona presente en la muestra.

Para realizar los análisis se siguieron las especificaciones del protocolo, de modo que se añadieron a cada pocillo 25 μ l de las soluciones estándar y de las muestras y 200 μ l de la enzima conjugada. Tras 60 min de incubación a temperatura ambiente y 3 lavados, se dispensó el sustrato en cada pocillo y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Se paró la reacción con la solución de frenado y se determinó la absorbancia a 450 nm de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron 3,28% y 4,73%, respectivamente, para la concentración menor de testosterona, y 4,16% y 9,94%, respectivamente, para la concentración mayor de testosterona.

Para el análisis de la concentración de **progesterona plasmática** se empleó también un ELISA de competición (DE1561, Demeditec Progesterone ELISA, Demeditec), en el que los pocillos estaban tapizados con un anticuerpo policlonal frente a un sitio antigénico de la molécula de progesterona. El protocolo es similar al descrito para la testosterona, a diferencia de que las muestras se extrajeron con éter de petróleo a una relación entre éter:muestra de 5:1 (v:v), siendo la eficiencia de la extracción del 85%. La sensibilidad

del *kit* fue 0,045 ng/ml y los coeficientes de variación intra- e inter-ensayos fueron de 5,5 y 6,9%, respectivamente.

Finalmente, para la determinación del **pico de LH** se utilizó un *kit* de ELISA homólogo validado por nuestro laboratorio (Rebollar *et al.*, 2012). Se trata de un ELISA de competición en el que primeramente se tapiza la placa con un anticuerpo anti-cobaya sin marcar (AL 35260, goat anti-guinea pig IgG (H+L), Southern Biotech), al cual se une el anticuerpo secundario específico de cobaya anti-LH de conejo (Dr. A.F. Parlow, Pituitary Hormones and Antisera Center, Harbor-UCLA MC) también sin marcar. A este anticuerpo secundario se adhiere la LH marcada con biotina (utilizando el *kit* EZ-Link® Biotinylation) o la LH de la muestra, de tal manera que al añadir el conjugado estreptavidina-HRP y el sustrato TMB, la coloración es inversamente proporcional a la cantidad de LH presente en la muestra. Para realizar la curva estándar se utilizó LH de conejo purificado de extracto de pituitaria de conejo (Dr. A.F. Parlow, Pituitary Hormones and Antisera Center, Harbor-UCLA MC) en un rango de 0,781 a 400 ng/ml. Se determinó la absorbancia a 450 nm en el lector de placas. Los coeficientes de variación inter-ensayo fueron 3,1 y 6,8% para la mayor y menor concentración y el coeficiente de variación intra-ensayo, 5,2%.

3.3.5. Extracción de ARN, producción de ADN complementario y PCR.

Para la extracción de ARN total, se lisaron los tejidos utilizando 1 ml de Trizol por cada 100 mg de tejido (cat#15596018, TRIzol™ Reagent, Life Technologies) y se purificaron utilizando el *kit* PureLink® RNA (cat#12183-018A, Life Technologies), siguiendo las instrucciones del protocolo.

Por un lado, para evaluar la expresión génica de β -NGF y sus receptores, lo primero que realizamos fue un tratamiento con DNasa (DNase I, RNase-free 1U/ μ L, ThermoFisher Scientific) para evitar la contaminación de las muestras con ADN genómico al ARN total (1 μ g) con un ratio 280/230 comprendido entre 1,8 y 2,1 (Nanodrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific). Por otro lado, para obtener un producto apropiado para la secuenciación mediante técnicas RACE para el genotipado de NGF en la producción de la proteína recombinante, se aisló ARNm a partir del ARN total con un *kit* comercial (FastTrack® MAG mRNA Isolation Kit, Life Technologies).

En ambos casos, para obtener ADN complementario (ADNc) a partir del ARN, se realizó la transcripción reversa con el *kit* SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Life Technologies) utilizando para ello una mezcla de *primers* para optimizar la transcripción (0,25µg/µl de *primers* oligo(dT)₁₂₋₁₈ y 25 ng/µl *random hexamers*). Después del tratamiento con la retrotranscriptasa SuperScript™ II durante 50 min a 4° C, las muestras se sometieron a 70° C durante 15 min (Mastercycler gradient, Eppendorf) para desnaturalizar la enzima y por último se trataron con RNasa H (Life Technologies) para eliminar los restos de ARN.

Los *primers* para determinar la expresión génica de β -NGF, *TrkA* y *p75*, así como de *GAPDH*, como gen de referencia, se diseñaron en base a las secuencias genéticas depositadas en la base de datos Genbank (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) con el programa OligoAnalizer® (Integrated DNA Technologies), procurando localizar los *primers* en diferentes exones del ADN y que el tamaño del producto final fuera de entre 50 y 200 pares de bases (pb), para evitar la amplificación de ADN genómico (Tabla 3.1). Con el fin de optimizar la temperatura de anillamiento de los pares de *primers* en cada gen, se realizaron PCRs a tiempo final (Mastercycler gradient, Eppendorf) de todos los tejidos con la polimerasa Platinum® Taq DNA Polymerase (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 3.1. *Primers de β -NGF y sus dos receptores para el análisis de PCR a tiempo real.*

Gen	Secuenciannucleótidos 5'- 3'	Tamaño del producto (bp)	Referencia de la secuencia en NCBI
β -NGF	F: GCCACGCTGAGGTGCATAG	89	XM_017345952.1
	R: TGCATGTGGTTCCGCCTGTAT		
<i>TrkA</i>	F: CGGCTGAGTCACCTGAATCTC	174	XM_008264290.2
	R: GAGTTCCCCGACAGGACC		
<i>p75</i>	F: TCGCCTTCAAGAGGTGGAACA	117	XM_008271321.2
	R: CAGAGATGCCGCTGTCACTA		
<i>GADPH</i>	F: GTCGGAGTGAACGGATTTGG	53	NM_001082253.1
	R: AAAGCAGCCCTGGTGACCA		

Para la cuantificación relativa de la expresión génica en todos los tejidos en las diferentes edades se realizó PCR a tiempo real, utilizando SYBR Green (SsoAdvanced™ Universal

SYBR Green Supermix, Bio-Rad). El ciclo de PCR utilizado fue el siguiente: 30 s a 95° C, 40 ciclos de 15 s a 95° C y 30 s a 62° C, terminando con una curva de disociación (ABI Prism® 7000 Sequence Detection System Applied Biosystems). Cada placa de análisis contenía duplicados de controles negativos sin muestra y controles negativos a RT (muestras en las cuales no se ha añadido la retrotranscriptasa en la fase de paso a ADNc). Para calcular la cuantificación de las muestras, se normalizaron los valores obtenidos al control endógeno (*GAPDH*) de acuerdo con Herrera-Luna *et al.*, (2012), y se relativizaron a la expresión en próstata, considerando este tejido como el de mayor expresión según la bibliografía (Maranesi *et al.*, 2015). La expresión relativa de los genes diana se recogieron como valores Ct y las variaciones entre ellos se determinaron utilizando la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Para secuenciar la parte conservada de la proteína se diseñaron *primers* (tabla 3.2) que delimitaban una región de la proteína conservada entre especies (305 pb). Esta región se identificó mediante el alineamiento de más de 50 especies con los programas Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y Serial Cloner 2.6 Software. El ciclo de PCR realizado con 1 µl de cDNA y la polimerasa Platinum® *Taq* fue el siguiente: una primera fase de desnaturalización (3 min a 95° C), seguida de 40 ciclos de alineamiento (30 s a 9° C, 30 s a 55° C y 15 s a 72° C) y una fase final de elongación (5 min a 72° C) (Mastercycler gradient, Eppendorf).

Tabla 3.2. *Primers de una región conservada entre especies de β -NGF.*

Gen	Secuencianucleótidos 5'- 3'	Tamaño del producto (bp)	Referencia de la secuencia en NCBI
β -NGF	F: AGCCCACTGGACTAACTGCA R: TCGCACACCGAGAACTCTCC	305	XM_017345952.1

3.3.6. Inmunohistoquímica

La técnica de inmunohistoquímica se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito previamente en nuestro laboratorio (Arias-Álvarez *et al.*, 2010) con algunas modificaciones. Tras la desparafinación con xileno (5 pases de 4 minutos cada uno) y la rehidratación con concentraciones decrecientes de etanol (100°, 96° y 70°), las secciones de tejido se incubaron con H₂O₂ durante 30 min para bloquear la peroxidasa endógena.

Seguidamente, se sometieron a un tratamiento térmico con olla exprés durante 3 min en 10 mM de buffer de citrato de sodio (pH 6), para inducir el desenmascaramiento antigénico. Para evitar las uniones inespecíficas, las muestras se bloquearon con suero normal equino (para β -NGF) o suero normal de cabra (para TrkA y p75) diluidos 1:10 (v:v) en PBS en cámaras húmedas durante 30 min a temperatura ambiente. Seguidamente, las muestras se incubaron toda la noche a 4° C (para β -NGF y TrkA) o a 37° C (para p75) en cámaras húmedas con los anticuerpos primarios: anti- β -NGF de cabra (1:100, N8773, Sigma Aldrich), anti-TrkA de ratón (1:200, ab-86474, Abcam) y anti-p75 de ratón (5 μ g/ml, ab3125, Abcam). En los controles negativos se sustituyó la incubación con el anticuerpo primario por PBS. Después, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado diluido 1:200 en PBS [biotinylated anti-goat IgG para β -NGF (BA9200, Vector Laboratories), biotinylated anti-mouse IgG para TrkA (BA9200, Vector Laboratories) y biotinylated anti-mouse IgG H&L (HPR) (ab-205719, Abcam) para p75] durante 30 min a temperatura ambiente. Los portas se trataron con el complejo avidin-biotin (ABC Vector Elite kit, Vector Laboratories) durante 30 min a temperatura ambiente, tras lo cual se incubaron con el cromógeno peroxidasa (Vector Nova RED substrate Kit for Peroxidase, Vector Laboratories). Finalmente, las preparaciones se contrastaron con hematoxilina, se deshidrataron con concentraciones crecientes de alcohol (96 y 100°) finalizando con 4 pases por xileno (1 min por cubeta), y se montaron con medio de montaje. Las secciones se analizaron por un único observador al microscopio óptico (Leica F550) equipado con una cámara DCF400. La intensidad de la señal se consideró como baja +, media ++ o intensa +++. Se utilizaron secciones de hipotálamo, hipófisis y melanoma como tejidos positivos.

3.3.7. Producción recombinante de β -NGF de conejo

3.3.7.1. Secuenciación de β -NGF a partir de la próstata de conejo

Una vez obtenidos los productos de PCR según lo descrito anteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% para visualizar las bandas (305 pb) utilizando un escáner de luz ultravioleta (Bio-Rad). Dichas bandas se cortaron del gel de agarosa, se purificaron utilizando el *kit* Speed Tools PCR Clean-up (Biotools) y se enviaron para su secuenciación por el método Sanger al Servicio de Genómica de la Facultad de Biológicas de la UCM.

Para obtener las secuencias de los extremos 5' y 3', se realizó una técnica denominada RACE (Zhu *et al.*, 2001), que consiste en amplificar una secuencia genética desconocida de un gen completo a partir de ARN total o mensajero (preferiblemente ARNm) mediante la adición de una secuencia conocida en el extremo 3' (3'RACE) y en el extremo 5' (5'RACE). La secuencia genética del gen completo se puede obtener con *primers* específicos de esas regiones de los extremos y de la región conocida del gen de interés. Las estrategias de unión de los adaptadores a los extremos del ADNc difieren ligeramente entre los *kits* comerciales. En este caso, se utilizó el *kit* SMARTer® RACE 5'/3' (Fig. 3.11) que en la reacción de retrotranscripción, utiliza un oligonucleótido (oligo(dT)) que se une a la cola de poliA del extremo 3' del ARNm y un oligonucleótido con una secuencia específica (SMARTer® II A), que se une al extremo 5' por medio de la actividad de la enzima retrotranscriptasa (SMART Scribe RT®), de tal manera que se obtiene una cadena de ADNc con secuencias conocidas a ambos extremos del gen.

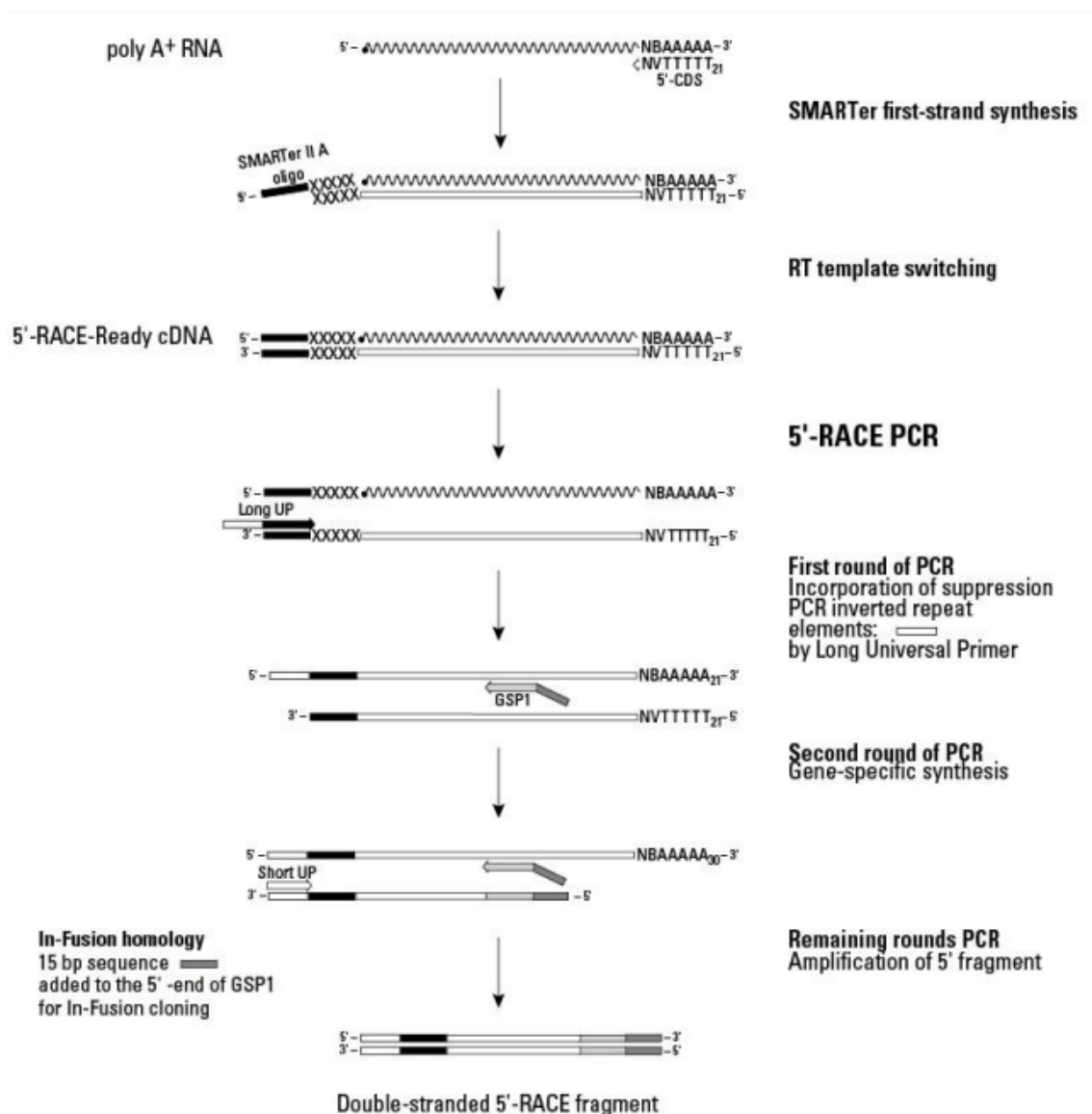


Figura 3.11. Esquema del fundamento de la técnica RACE. Fuente: Protocolo del kit SMARTer® RACE 5'/3'.

Se diseñaron *primers* específicos (*outer primers*) localizados en la región conocida para ambos extremos del gen. Así, para secuenciar el extremo 5' se utilizaron el *primer* del kit para este extremo y el *reverse primer* diseñado previamente (tabla 3.2); del mismo modo, para el extremo 3' se utilizaron el *primer* del kit y el *forward primer* diseñado. Como se obtuvo en el gel de agarosa más de una banda, se diseñaron *primers* anidados o *inner primers* para aumentar la especificidad de la PCR (tabla 3.3). Se utilizó el ciclo de PCR recomendado por el *kit*, con una temperatura de anillamiento de 68° C (Mastercycler gradient, Eppendorf).

Tabla 3.3. Primers específicos diseñados para la técnica RACE. *T_m*: temperatura de anillamiento, analizada mediante el programa OligoAnalyzer.

Primer	Secuencia 5' – 3'	T _m (°C)
3' <i>outer</i>	GGGCAGACCCGCAACATCACCGT	70
3' <i>inner</i>	CCCCAGACTTTTAAAGAAACGACGCCTG	70,1
5' <i>outer</i>	TCGCACACCGAGAACTCTCCCATGTG	71
3' <i>inner</i>	GTCCACCTCCAGGTCCAGCTCCT	70

A continuación, se cortaron las bandas obtenidas en el gel de agarosa y se procedió a su purificación para extraer el ADNc mediante un *kit* comercial (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel). Cada banda purificada se insertó en un plásmido pCR4 TOPO (TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing, Invitrogen, Life Technologies) con resistencia a ampicilina, se transformaron en células competentes (Stellar™ Competent Cells, Clontech) y se cultivaron en placas de LB-Agar con una concentración de 100 µg/ml de ampicilina (Thermo Fisher Scientific) para que creciesen únicamente las bacterias en las que se expresara dicho gen de resistencia del plásmido. Tras 24 h de incubación a 37°C, se diferenciaron colonias blancas y azules (Fig. 3.12). Las blancas contienen el gen experimental insertado en el plásmido, ya que impiden la expresión del gen *LacZα*, que codifica la β-galactosidasa responsable de dar la coloración a las colonias en presencia de XGal e IPTG. Se realizó el cultivo en medio líquido con 100 µg/ml de ampicilina de las colonias blancas y se incubaron 24 h a 37°C. Posteriormente, se extrajo el plásmido con un *kit* específico (Speedtools Plasmid DNA Purification Kit, Biotools) de aquellos medios de cultivo líquidos donde había crecimiento celular. A continuación, se realizó una PCR con los *primers* diseñados para RACE y se secuenciaron en el Servicio de Genómica de la Facultad de Biológicas de la UCM.

La secuencia completa de β-NGF de próstata de conejo, junto con la parte pro en el extremo 5', se envió a la base de datos GenBank, con el número de acceso KX528686, publicado recientemente (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX528686>).

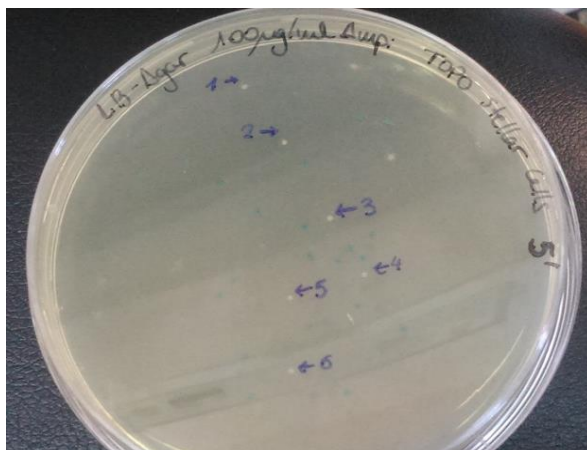


Figura 3.12. Crecimiento de colonias blancas (1-6) que contienen el plásmido pc2539-CEF-NGF. Fuente propia.

3.3.7.2. Producción del plásmido y preparación de la secuencia para la transfección en células CHO

La línea celular de ovario de hámster chino (CHO) fue cedida por el Dr. Juan Tamargo, de la Facultad de Medicina de la UCM.

La secuencia KX528686 con una cola de 7 histidinas en el extremo C-terminal, se insertó en el plásmido pD2539-CEF por la empresa DNA 2.0 (California, EEUU), con las características optimizadas para la transfección en células CHO. Este plásmido cuenta con resistencia a kanamicina y a puromicina, que posibilitan el crecimiento específico de las células que contienen el plásmido en presencia de kanamicina (en caso de procariotas) o puromicina (en caso de eucariotas). El plásmido con la secuencia de interés (pD2539-CEF-NGF) se produjo en grandes cantidades en células competentes (Stellar™ Competent Cells, Clontech) en medio LB suplementado con 25 µg/ml de kanamicina, y se extrajo del medio con un *kit* comercial para la extracción de grandes cantidades de plásmido (MegaPrep, PureLink® HiPure Plasmid Megaprep Kit, Invitrogen). El plásmido se precipitó con isopropanol/etanol y se cortó mediante enzimas de restricción (específicamente, la enzima Sal I) para linearizar la secuencia y poder transfectarla en células CHO.

3.3.7.3. Cultivo y transfección de células CHO

Para el cultivo de las células CHO se utilizó el medio Ham F-12 (Sigma Aldrich) suplementado con 25 mM de HEPES (Gibco, Thermo Fisher Scientific), 10% de suero fetal bovino (OneShot™ FBS, US origin, Gibco, Thermo Fisher Scientific), 125 µg/ml de gentamicina (Invitrogen, Life Technologies) y 5 µg/ml de puromicina (Thermo Fisher Scientific). Tras su descongelación y centrifugación a 1800 x g para eliminar el DMSO utilizado en la congelación, las células CHO se cultivaron en el medio descrito durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, se realizó un cambio de medio y se mantuvieron en las condiciones especificadas, recambiando el medio cada 48 h. En el momento de la transfección, se cultivaron 30.000 células en placas de 24 pocillos y se administró 1,5 µl de lipofectamina (Lipofectamine® 2000 Reagent, Invitrogen, Life Technologies). Se seleccionaron los pocillos en los que se observaba un crecimiento celular constante, sin perder la morfología alargada típica de las células CHO.

Así, se eligieron 3 clones (14B4, 19A3 y 19B3) y se realizó WB para comprobar la presencia de la proteína en el medio de cultivo.

3.3.7.4. Purificación de la proteína recombinante a partir del medio celular

Para eliminar las proteínas presentes en el medio de cultivo y poder purificar la proteína recombinante, se cultivaron 500.000 células/ml en frascos de 160 cc (Thermo Fisher Scientific) en medio libre de suero (CHO-S-SFM II, with hypoxanthine and thymidine, Thermo Fisher Scientific) suplementado con 50 µg/ml de gentamicina y 5 µg/ml puromicina. Se mantuvieron en agitación en un incubador Hera cell 150 (Heraeus) a 37° C y 5% de CO₂ durante 4 días.

La purificación se realizó mediante columnas de níquel (HisXL-Column High Density Nickel, ABT) (Fig. 3.13), de tal manera que la cola de histidinas insertada en la proteína recombinante producida se quedaba adherida al níquel. Se equilibraron las columnas con *buffer* de unión (20 mM fosfato disódico, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 7.5), tras lo cual se incubó el medio de cultivo en la columna durante 15 min. Después de varios lavados de la columna



Figura 3.13.
Columnas de
purificación. Fuente
propia.

para eliminar restos de otras proteínas con *buffer* de unión, la proteína recombinante se eluyó en 10 ml de *buffer* de elución (20 mM fosfato disódico, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol). Una vez purificada, la proteína se introdujo en bolsas de diálisis (Medicell), se concentró con sacarosa y se realizaron diálisis en serie (3 diálisis de al menos 3 h cada una a 4° C) en HEPES 10 μ M para el ensayo de la funcionalidad de la proteína en las células PC12, o en PBS 0,01 M para mantener la viabilidad espermática en el ensayo del efecto de la proteína en los espermatozoides. La detección de la proteína purificada, concentrada y dializada se determinó mediante WB. La concentración de la proteína fue analizada mediante el método de Bradford.

3.3.7.5. MALDI-TOF

Para comprobar la secuencia proteica de la proteína recombinante producida se realizó una electroforesis SDS-PAGE seguida de la tinción del gel con Coomassie para poder visualizar la banda a cortar, que seguidamente se sometió a procesos de reducción, alcalinización y digestión con tripsina, de acuerdo a Sechi (2002). Los análisis de espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF) se realizaron en un espectrofotómetro de masas (4800 Plus Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF mass spectrometer, Applied Biosystems, MDS Sciex) en el Servicio de Proteómica de la Facultad de Farmacia de la UCM y de acuerdo con lo descrito en Garcia-Garcia *et al.* (2018a). Para identificar la secuencia proteica se comparó la secuencia KX528686 con la secuencia obtenida de la banda de 13-15 kDa de SDS-PAGE utilizando MASCOT v 2.3 (www.matrixscience.com) a través del servidor Global Protein Server v 3.6 (ABSCIEX). En todas las proteínas identificadas, el valor fijado como significativo por MASCOT fue un p valor < 0,05.

3.3.7.6. Ensayo de actividad biológica con células PC12

La línea celular de feocromocitoma de médula adrenal de rata (PC12) fue cedida por la Dra. M. Pilar Gómez-Serranillos, de la Facultad de Farmacia de la UCM.

Tras la descongelación y la centrifugación a 1800 x g de las células para eliminar el DMSO, las células se cultivaron en frascos de 75 cc en DMEM (DMEM, high glucose, HEPES) suplementado con 0,2 mM de piruvato, 10% de suero de caballo inactivado por

calor (origen de Nueva Zelanda), 5% de suero fetal bovino y 50 µg/ml de gentamicina. Todos los reactivos se adquirieron en Thermo Fisher Scientific. Las células se mantuvieron en el incubador NuAire a 37 °C y 5% CO₂, realizando cambio de medio cada 48 h, hasta el momento de los experimentos.

Para los experimentos, las células PC12 se cultivaron a una densidad de 15.000 células/500 µl y se mantuvieron durante 24 h. Tras ello, se añadieron diferentes concentraciones de β-NGF recombinante diluido en HEPES 10 µM al medio de cultivo, de acuerdo con Gunning *et al.*, (1981), siendo las concentraciones: 0, 5, 10, 25, 50 y 100 ng/ml. Cada 48 h se realizaba un cambio de medio añadiendo la concentración correspondiente del β-NGF recombinante.

a) Prueba de viabilidad con MTT

Con el objetivo de determinar si el β-NGF recombinante tenía un efecto citotóxico en las células PC12 se realizó un análisis de viabilidad 48 h después de la adición de las diferentes dosis del β-NGF recombinante con el compuesto MTT (M6494, Thermo Fisher Scientific). De este modo, se añadieron 200 µl de MTT (500 µg/ml) suspendidos en medio de Locke (140 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 5,5 mM glucosa, 10 mM HEPES) a cada pocillo y se incubaron durante 2 h a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 200 µl de *buffer* de solubilización (0,1 M HCl, 1% Triton X-100 en isopropanol) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente para solubilizar los cristales de formazán. Después se raspó el fondo de los pocillos (Sterile cell scrapers, Lab Clinics) y el contenido de cada pocillo se dispensó en tubos con 0,9 ml de agua destilada (Fig. 3.14). Finalmente, se midió la densidad óptica (DO) de cada muestra a 560 nm utilizando un espectrofotómetro (UltroSpec III spectrophotometer, Pharmacia LKB, GE Healthcare Life Science). Los datos se analizaron como porcentaje de viabilidad celular, calculado por la ecuación: (DO de células tratadas / DO de células no tratadas) x 100.

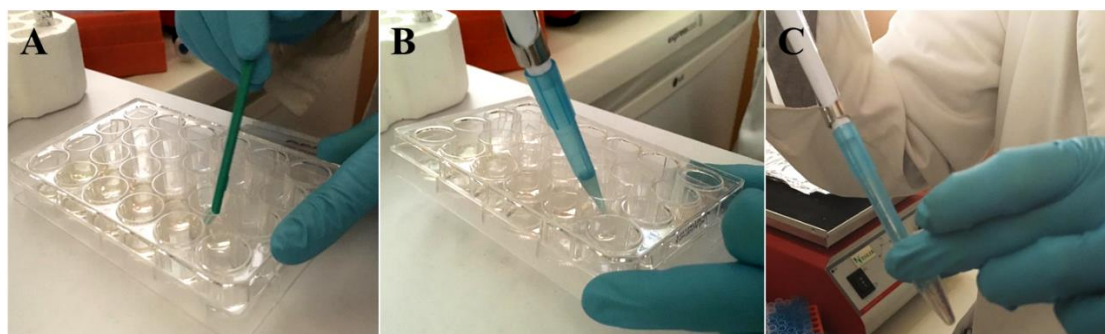


Figura 3.14. Procedimiento del raspado de los pocillos para la prueba de viabilidad de las células PC12. A) Raspado de cada pocillo individualmente. B) Aspiración del contenido de cada pocillo. C) Mezcla con agua destilada para medir la absorbancia. Fuente propia.

b) Análisis de diferenciación y crecimiento de neuritos

En este experimento, se procedió a tapizar las placas con $7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de colágeno tipo IV (C6745, Sigma-Aldrich) siguiendo la instrucciones del protocolo. El cultivo se mantuvo durante 8 días, cambiando el medio con las diferentes concentraciones de β -NGF recombinante cada 48 h. Se tomaron imágenes con una cámara DCF400 adaptada a un microscopio equipado con contraste de fases (Leica F550) y se analizaron al menos 100 células de cada concentración. La diferenciación celular se analizó teniendo en cuenta el porcentaje de células diferenciadas (pérdida de forma redondeada), el porcentaje de células con al menos un neurito y la longitud del neurito más largo de una célula en el día 8 (Fig. 3.15). Todo ello se analizó con el programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>), considerando neuritos a las prolongaciones citoplasmáticas con una longitud mínima de un diámetro celular, de acuerdo con Haas *et al.*, (2016).

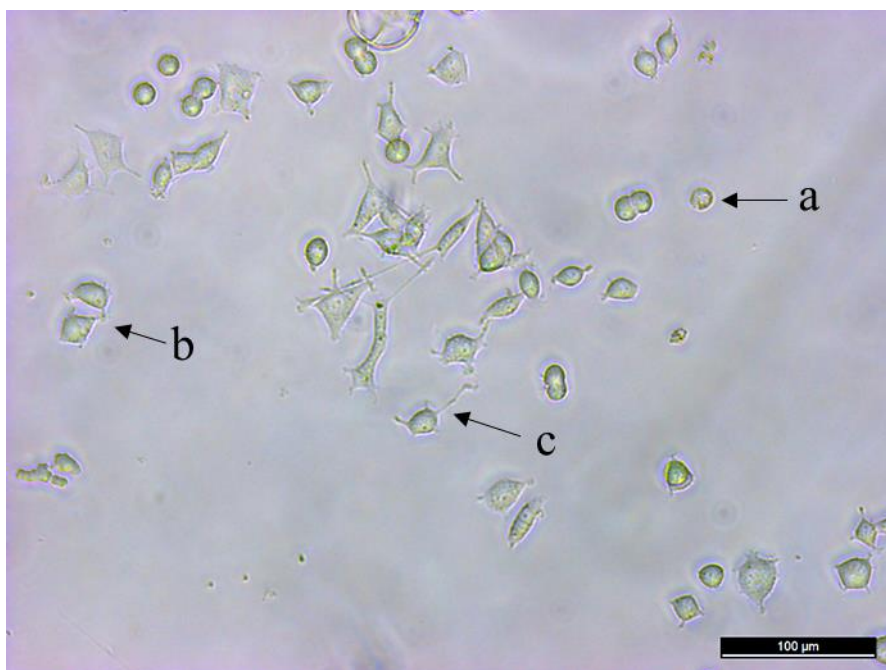


Figura 3.15. Imagen de microscopio óptico de campo claro a 20x de un cultivo de células PC12 en las que se muestra: a) célula con forma redondeada, no diferenciada; b) pérdida de forma redondeada, y c) neurito de una célula diferenciada. Fuente propia.

c) Pruebas de inmunofluorescencia frente a β -III tubulina

Para verificar que las células PC12 se diferenciaban en células tipo neurona, se realizaron pruebas de inmunofluorescencia frente a β -III tubulina a los 8 días de cultivo con 25 ng/ml del β -NGF recombinante. Para ello, se utilizó el anticuerpo primario anti- β -III-tubulina, que forma parte del microtúbulo y se encuentra de manera casi exclusiva en neuronas. En este caso, se tapizaron cubre-objetos redondos con poli-L-lisina (Biochrom) para facilitar la adhesión de las células. El cultivo celular se realizó como se ha descrito en los apartados anteriores; el día 8 de tratamiento, se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS 0,1M (16 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 84 mM Na_2HPO_4). Se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 15 min a temperatura ambiente y después se permeabilizó la membrana celular con Triton X-100 al 0,1% diluido en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Tras varios lavados, se realizó un bloqueo con suero fetal bovino al 10% diluido en PBS durante 45 min a temperatura ambiente para evitar las uniones inespecíficas. Se incubó el anticuerpo primario anti- β -III-tubulina (ab52623, Abcam) a una concentración de 1:50, a 4° C durante toda la noche. Al día siguiente, se lavaron las células con PBS y se incubaron 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-rabbit Alexa Fluor® 488 (ab150081, Abcam) diluido 1:500. Para teñir

los núcleos se utilizó Hoescht (B2261, Sigma-Aldrich) a una concentración de 15 $\mu\text{g/ml}$. Los cubre-objetos se montaron en porta-objetos con medio de montaje para inmunofluorescencia (VectaShield, VectaStain, Vector Laboratories) y las preparaciones se visualizaron con un sistema de imagen confocal (Leica, TCS SP5®), utilizando láser de excitación a 351/364 y 488 nm para observar la tinción Hoescht y la anti- β -III tubulina, respectivamente.

d) Evaluación de la inhibición del receptor TrkA

Finalmente, se realizó un experimento con un inhibidor específico del receptor de alta afinidad de la neurotrofina (TrkA), el K-252a (Sigma-Aldrich) para asegurar que el β -NGF recombinante era el responsable de la diferenciación de las células PC12. El inhibidor se añadió al medio por triplicado tras 24 h de cultivo a una concentración de 100 nM, se incubó durante 2 h a 37 °C y posteriormente se añadieron 25 ng/ml del β -NGF recombinante. Paralelamente se cultivaron triplicados de células sin ningún tratamiento (ni β -NGF recombinante ni K-252a) y células tratadas únicamente con 25 ng/ml de β -NGF recombinante. Se tomaron imágenes como se ha descrito anteriormente a las 48 h de cultivo para valorar la diferenciación de las células PC12.

3.3.8. Estudio de la secuencia proteica del β -NGF recombinante en comparación con otras especies

Se alinearon las secuencias proteicas del NGF de próstata de conejo secuenciado previamente en nuestro laboratorio (KX528686) y de diferentes especies de ovulación inducida (*Camelus dromedarius*, *Camelus bactrianus*, *Camelus ferus*, *Lama lama*, *Vicugna pacos*) y espontánea (*Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Bos Taurus*, *Homo sapiens*) mediante el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Se analizaron las diferencias en los sitios de glicosilación, los puentes disulfuro, la parte pro del NGF, la cadena beta y los sitios de unión a los receptores.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para realizar los análisis estadísticos se utilizó el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis Systems, SAS/ STAT User's Guide, Release 9.0, Inst. Inc, Cary NC, EEUU). En todos los casos, se llevo a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) y se utilizó el test de *Fisher* como método *post-hoc* de comparación de medias. Los resultados se muestran como media \pm error estándar de la media y las diferencias se consideraron significativas con un valor de $p < 0,05$.

Para analizar los resultados relacionados con el objetivo 1, los parámetros seminales, la concentración de β -NGF en el plasma sanguíneo y PS, los niveles plasmáticos de testosterona y el ratio densitométrico β -NGF/ β -actina del PS, evaluados en machos de 22 y 37 semanas fueron analizados mediante un ANOVA de medidas repetidas (PROC MIXED), tomando las semanas como efecto fijo. Por otro lado, para el análisis de las variaciones en la expresión génica relativa de β -NGF, TrkA y p75, se realizó también un ANOVA de medidas repetidas (PROC MIXED), considerando como efectos fijos las semanas (22 y 37) y los tejidos (próstata, glándula bulbouretral, cabeza y cola del epidídimo), incluyendo en el modelo la interacción entre ambos efectos. Asimismo, para determinar la correlación entre los niveles plasmáticos de β -NGF y testosterona y entre β -NGF en PS y niveles plasmáticos de testosterona se calculó el coeficiente de correlación de Pearson.

Para el análisis de los estudios dosis-respuesta relacionados con el objetivo 2, la viabilidad y diferenciación de las células PC12, el crecimiento de los neuritos y los parámetros seminales fueron evaluados mediante un ANOVA, con las concentraciones del β -NGF recombinante (0, 5, 10, 25, 50, 100 ng/ml) como efecto fijo.

Finalmente, para analizar los resultados con respecto al objetivo 3, los parámetros seminales y ováricos se analizaron mediante ANOVA, con los diferentes grupos experimentales como efecto fijo. Los parámetros del experimento *in vivo*, se analizaron en hembras ovuladas y no ovuladas, de manera independiente. La tasa de la ovulación se analizó mediante una chi-cuadrado χ^2 . Por último, para evaluar las concentraciones plasmáticas de LH y progesterona se utilizó un ANOVA de medidas repetidas con el tratamiento y el tiempo como efectos fijos e incluyendo en el modelo la interacción entre ambos efectos.

4 . RESULTADOS

4 . 1

Caracterización del sistema β -NGF en el aparato reproductor masculino de los conejos durante la madurez sexual y relación de los niveles de β -NGF plasmáticos y del plasma seminal con el nivel de testosterona plasmática.

4.1.1. Expresión del ARNm de β -NGF, TrkA y p75 en el tracto reproductor masculino

La próstata fue el tejido en el que se detectó mayor expresión de ARNm de β -NGF, siendo significativamente más abundante que en el resto de tejidos ($p < 0,05$, Fig. 4.1). Sin embargo, los receptores se expresaron de forma similar en todos los tejidos. Por otro lado, la expresión génica de β -NGF fue mayor que la expresión de los dos receptores en todos los tejidos estudiados. En ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica en función de la edad.

4.1.2. Inmunolocalización de β -NGF, TrkA y p75 en el tracto reproductor masculino

En este estudio, se comprobó que existía señal en los tejidos considerados como controles positivos (hipotálamo, hipófisis y melanoma) mientras que los controles negativos no mostraron tinción (Fig. 4.2).

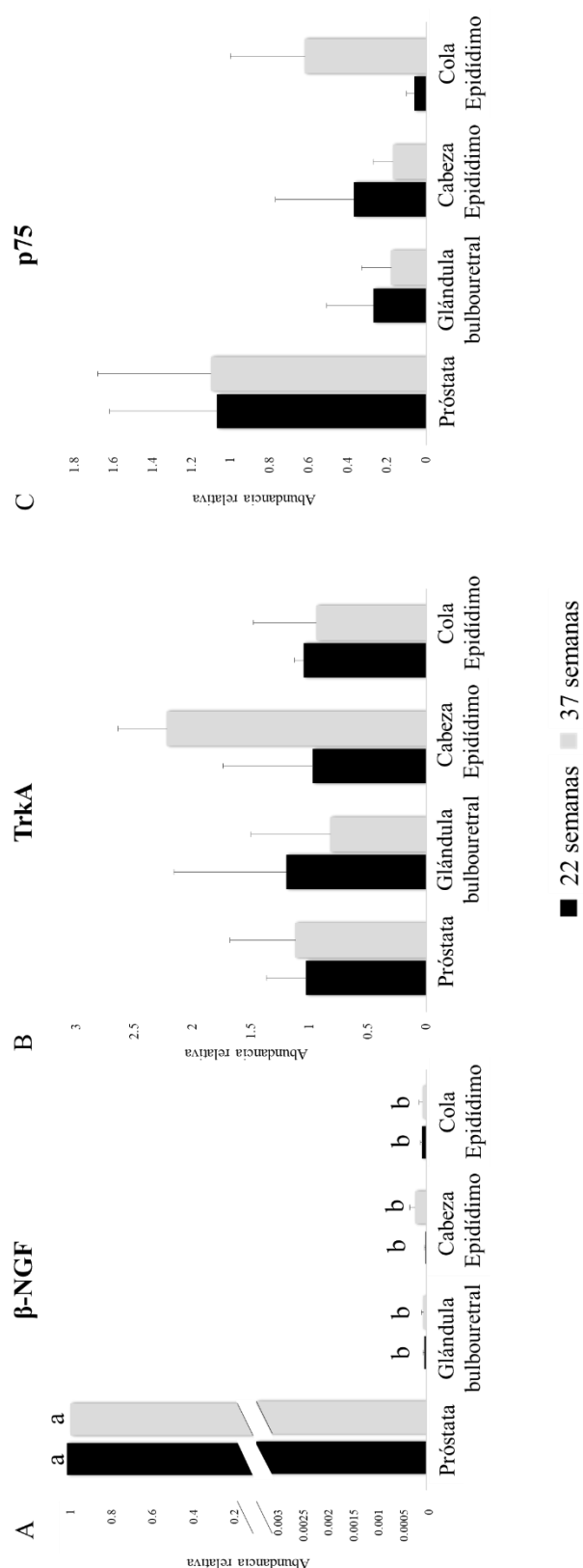


Figura 4.1. Abundancia relativa de la expresión de ARNm de β -NGF, TrkA y p75 en próstata, glándula bulbouretral y cabeza y cola de epidídimo en conejos de 22 y 37 semanas de edad. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

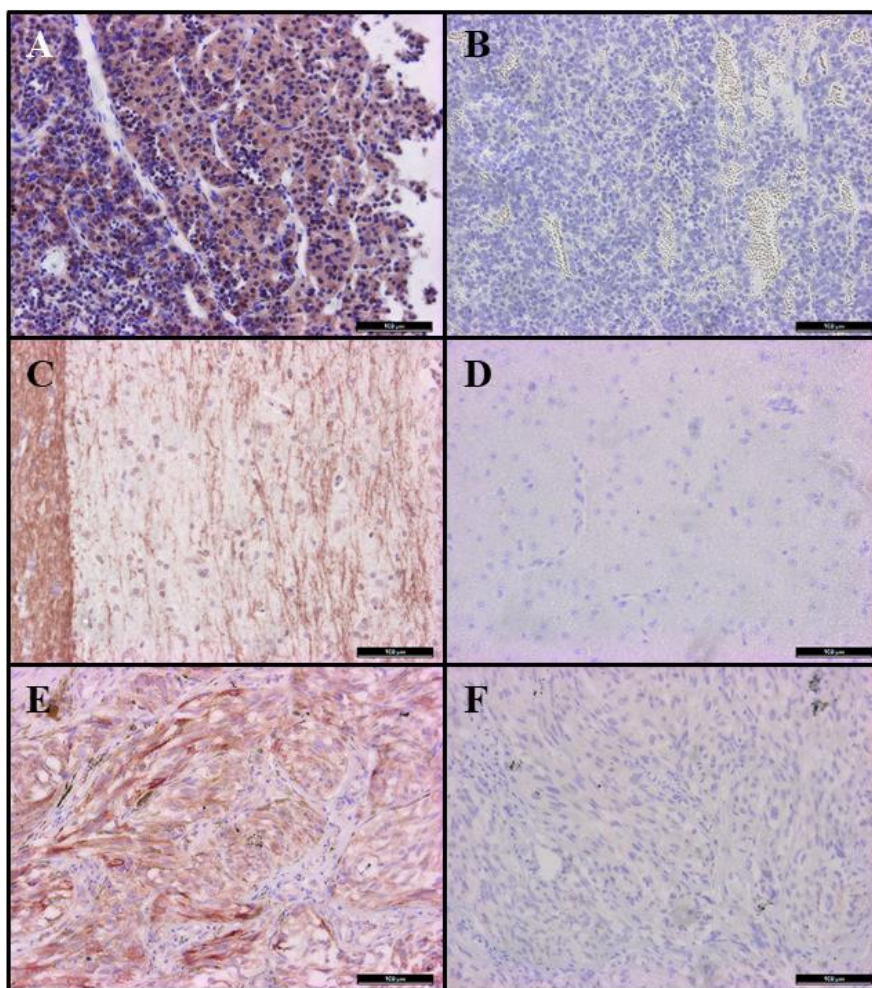


Figura 4.2. Tejidos positivos para β -NGF (hipófisis, A), TrkA (hipotálamo, C) y p75 (melanoma, E). B, D y F son los controles negativos de cada tejido (incubados con PBS en lugar del anticuerpo primario).

4.1.2.1. β -NGF

En la figura 4.3 se muestra la tinción de β -NGF de los tejidos analizados a las 22 y 37 semanas. Se puede observar que la neurotrofina se localizó principalmente en el lumen y en las células epiteliales de la **próstata** (+++), distribuyéndose en mayor medida en la zona apical en individuos más jóvenes en comparación con los mayores, donde se tiñó el citoplasma de manera homogénea. El tejido intersticial se tiñó de manera moderada (++) en conejos de 22 semanas de edad, en contraste con los conejos de 37 semanas de edad, que no mostraron tinción en este tejido.

En las **glándulas bulbouretrales** se observó baja señal (+) en el tejido intersticial en los conejos más jóvenes y media (++) en los mayores. El resto del tejido no mostró tinción, al igual que ninguna de las estructuras de la cabeza/cola del **epidídimo**.

4.1.2.2. Receptor de alta afinidad, TrkA

La distribución en la **próstata** del receptor de β -NGF de alta afinidad fue similar en ambas edades, apareciendo en las membranas y núcleos de las células epiteliales con una señal intensa (+++) y en el tejido intersticial con baja señal (+) (Fig. 4.4). En las **glándulas bulbouretrales**, TrkA mostró una fuerte señal (+++) en el citoplasma y el núcleo de las células epiteliales en ambas edades y una baja señal (+) en el tejido intersticial. En el caso del **epidídimo**, la tinción tanto en las células epiteliales como en el tejido intersticial fue intensa en la cabeza y en la cola (+++) en ambas edades: los estereocilios presentes en la cabeza del epidídimo se tiñeron de forma intensa en ambas edades.

4.1.2.3. Receptor de baja afinidad, p75

El receptor se distribuyó de forma heterogénea en las células epiteliales de la **próstata** en ambas edades, mientras que en el tejido intersticial no se observó tinción (Fig. 4.5). Sin embargo, el citoplasma de las células epiteliales de las **glándulas bulbouretrales** se tiñeron intensamente (+++) en individuos jóvenes y de una manera moderada (++) en conejos de 37 semanas de edad. No se detectó señal para p75 en el tejido intersticial de esta glándula. En el **epidídimo** se tiñeron de manera heterogénea los estereocilios presentes en la cabeza, en ambas edades. En los machos de 22 semanas se observó baja señal (+) en el tejido intersticial de la cola epididimaria. El resto de estructuras del epidídimo no se tiñeron.

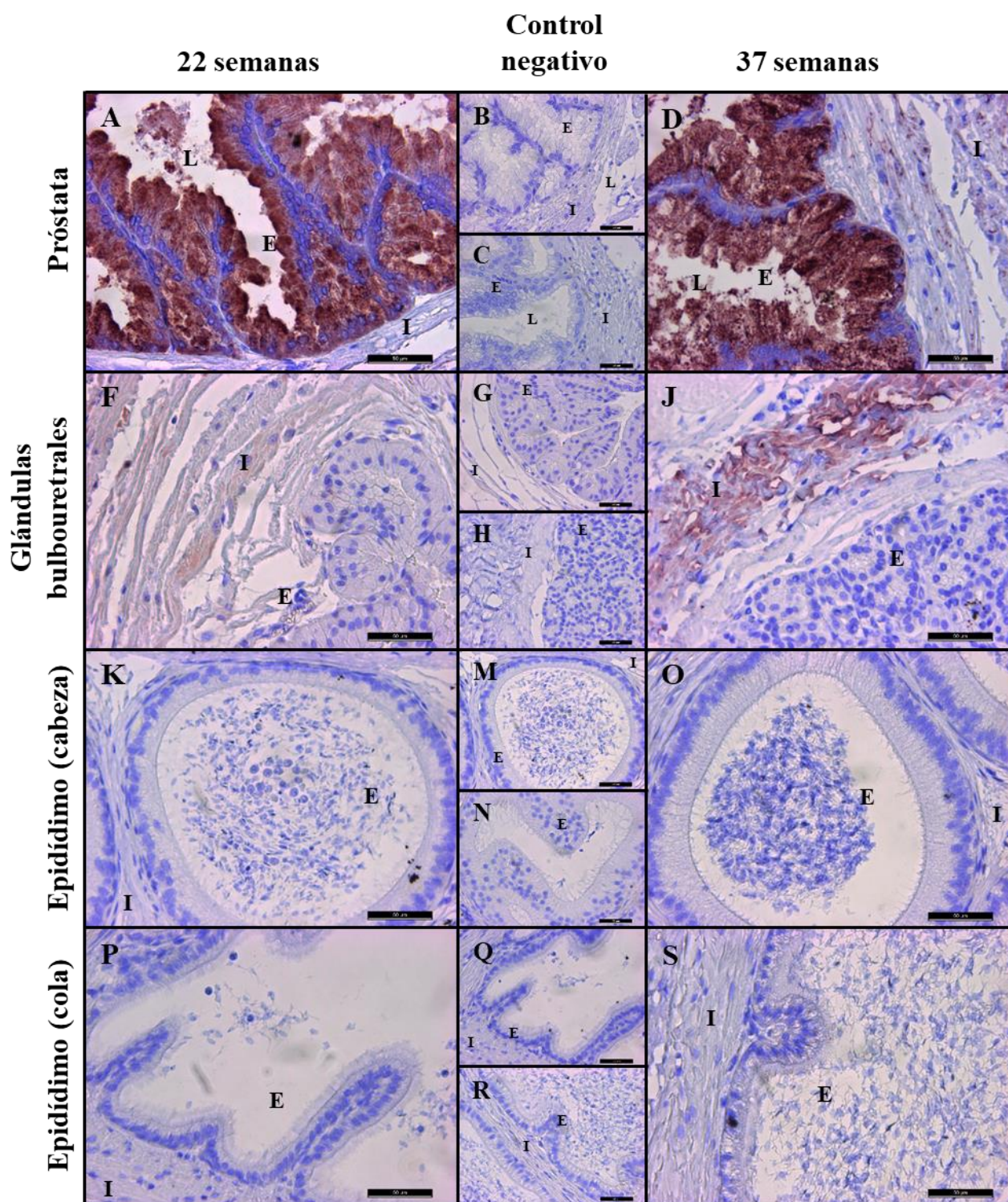


Figura 4.3. Localización de β -NGF en próstata (A, D), glándulas bulbouretrales (F, J), cabeza del epidídimo (K, O) y cola del epidídimo (P, R) en conejos de 22 semanas (A, F, K, P) y 37 semanas (D, J, O, S) de edad. Las imágenes del panel central son controles negativos (incubados con PBS en lugar del anticuerpo primario) de machos de 22 (B, G, M, Q) y 37 (C, H, N y R) semanas de edad. Abreviaturas: E, células epiteliales; I, tejido intersticial; L, lumen. Escala de barra 50 μ m.

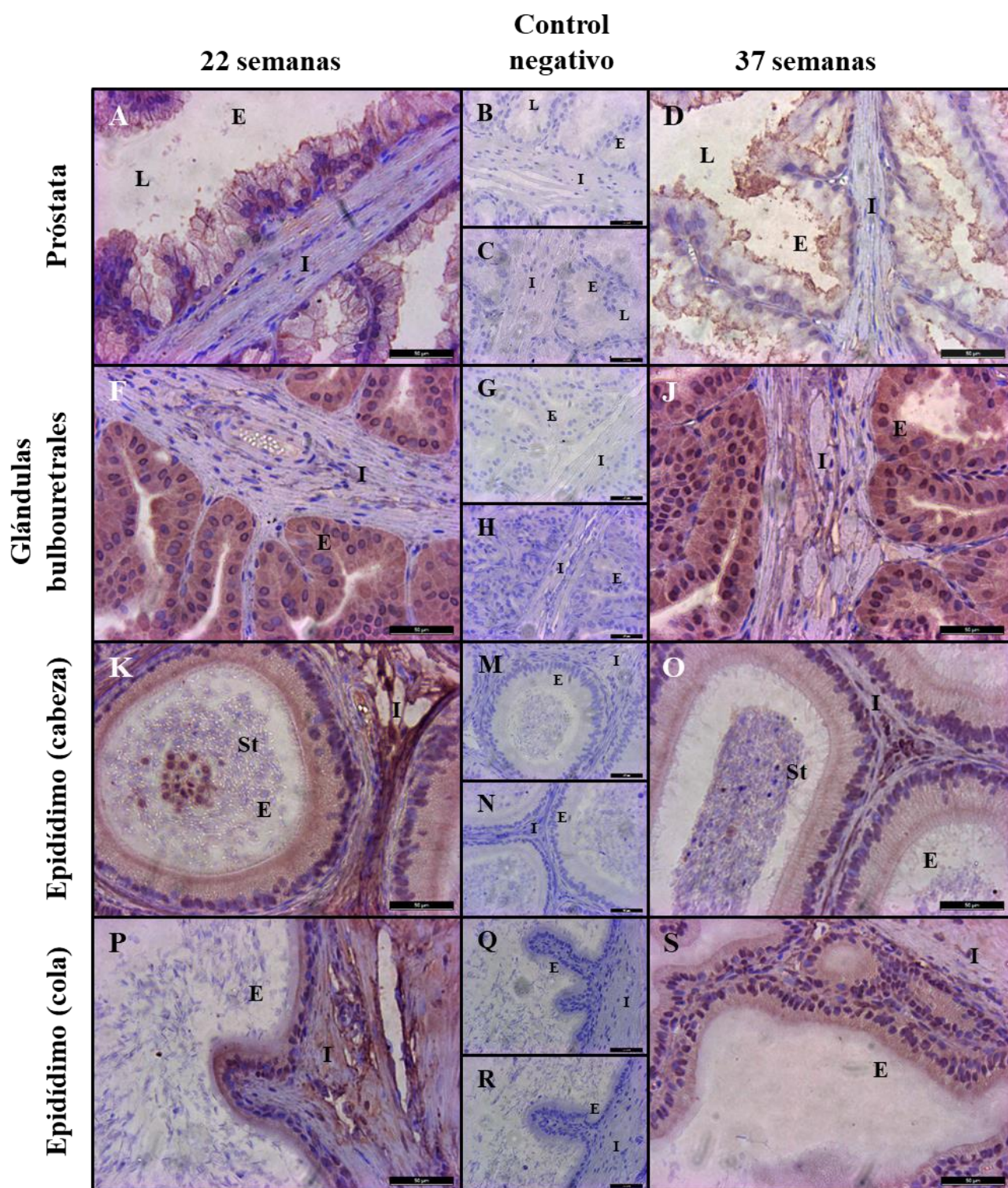


Figura 4.4. Localización de TrkA en próstata (A, D), glándulas bulbouretrales (F, J), cabeza del epidídimo (K, O) y cola del epidídimo (P, R) en conejos de 22 semanas (A, F, K, P) y 37 semanas (D, J, O, S) de edad. Las imágenes del panel central son controles negativos (incubados con PBS en lugar del anticuerpo primario) de machos de 22 (B, G, M, Q) y 37 (C, H, N y R) semanas de edad. Abreviaturas: E, células epiteliales; I, tejido intersticial; L, lumen; St, estereocilios. Escala de barra 50 μ m.

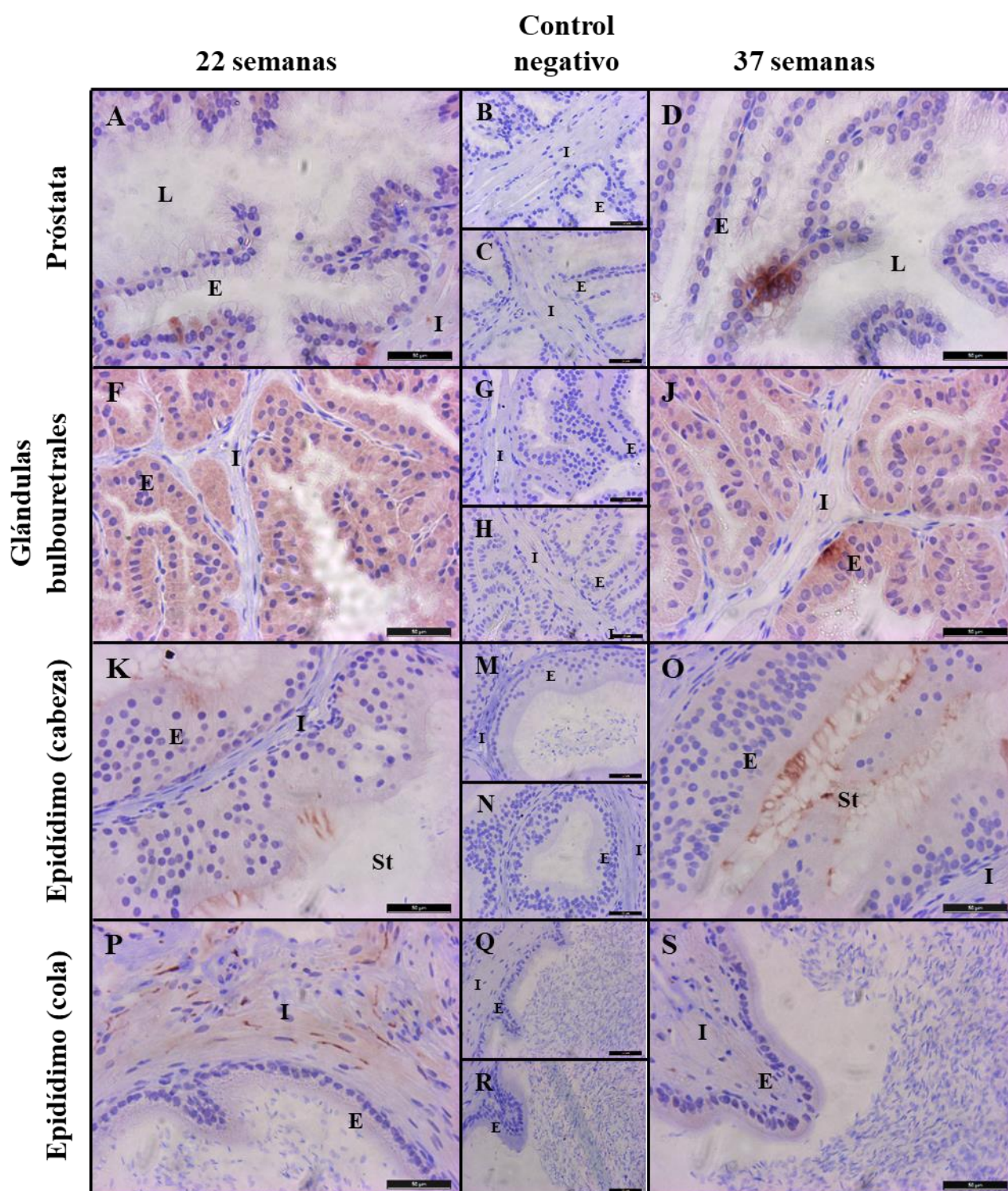


Figura 4.5. Localización de p75 en próstata (A, D), glándulas bulbouretrales (F, J), cabeza del epidídimo (K, O) y cola del epidídimo (P, R) en conejos de 22 semanas (A, F, K, P) y 37 semanas (D, J, O, S) de edad. Las imágenes del panel central son controles negativos (incubados con PBS en lugar del anticuerpo primario) de machos de 22 (B, G, M, Q) y 37 (C, H, N y R) semanas de edad. Abreviaturas: E, células epiteliales; I, tejido intersticial; L, lumen; St, estereocilios. Escala de barra 50 μ m.

4.1.3. Características seminales

Los resultados relacionados con el análisis del semen en las dos edades estudiadas se muestran en la tabla 4.1. La concentración espermática determinada con cámara de Neubauer así como los parámetros analizados mediante CASA de motilidad total (MOT) y motilidad progresiva (PMOT) fueron significativamente mayores en los individuos de 37 semanas de edad ($p<0,05$). Por otro lado, otros parámetros de calidad como el porcentaje de formas anormales y el de espermatozoides estáticos (STAT) fueron significativamente menores en los individuos de mayor edad ($p<0,05$).

Tabla 4.1. Características seminales en conejos de 22 y 37 semanas ($n=6$) con 3 replicados por cada edad. Las letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Parámetros seminales	Edad del conejo	
	22 semanas	37 semanas
Volumen (mL)	1,11 \pm 0,11	0,77 \pm 0,13
Concentración (10^6 sperm/ mL)	111,32 \pm 68,70 ^a	264,5 \pm 139,4 ^b
Motilidad en masa (1 a 4)	2,97 \pm 0,26	3,80 \pm 0,29
Espermatozoides vivos (%)	52,45 \pm 5,67	68,20 \pm 6,28
Formas anormales (%)	28,50 \pm 6,4 ^a	27,60 \pm 6,5 ^b
Integridad del acrosoma (%)	67,04 \pm 4,91	72,73 \pm 5,44
Parámetros CASA		
Motilidad total, MOT (%)	68,11 \pm 1,79 ^a	77,03 \pm 2,26 ^b
Motilidad progresiva, PMOT (%)	24,26 \pm 2,38 ^a	39,21 \pm 2,72 ^b
Espermatozoides estáticos (STAT, %)	32,73 \pm 1,82 ^a	22,93 \pm 2,32 ^b
Velocidad curvilínea (VCL, μ m/s)	98,21 \pm 3,94	95,97 \pm 4,70
Velocidad rectilínea (VSL, μ m/s)	41,88 \pm 2,92	49,63 \pm 3,29
Velocidad media de la trayectoria (VAP, μ m/s)	65,03 \pm 2,29	66,22 \pm 2,04
Desplazamiento lateral de la cabeza espermática (ALH, μ m)	2,64 \pm 0,10	2,40 \pm 0,12
Linearidad (LIN, %)	43,73 \pm 3,28	52,75 \pm 3,68
Rectilinearidad (STR, %)	63,48 \pm 3,18	71,63 \pm 2,97
Balanceo (WOB, %)	69,74 \pm 2,96	72,38 \pm 2,8
Frecuencia de golpe cruzado (BCF, Hz)	9,89 \pm 0,24	10,37 \pm 0,30

4.1.4. Detección de β -NGF en PS

La presencia de β -NGF en el PS se confirmó mediante WB en ambas edades, no apareciendo diferencias significativas en el ratio β -NGF/ β -actina obtenido mediante densitometría de las bandas entre 22 y 37 semanas (Fig. 4.6).

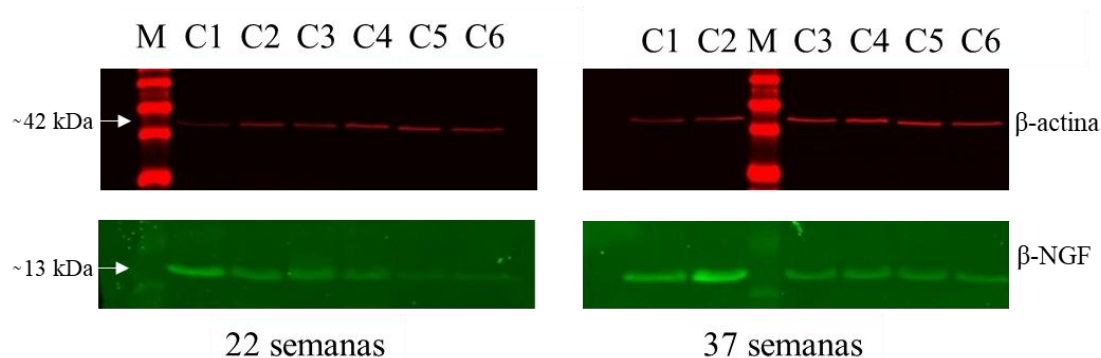


Figura 4.6. Western blot de β -NGF vs. β -actina del PS de Conejos de 22 y 37 semanas. M: marcador de peso molecular (10-250 kDa). C1-C6: PS del conejo 1-6.

4.1.5. Concentraciones de β -NGF en PS y plasma sanguíneo y testosterona plasmática y correlación entre ellos

La concentración de β -NGF en PS fue aproximadamente el doble que en el plasma sanguíneo y no se observaron diferencias significativas entre machos jóvenes y adultos en ningún caso (tabla 4.2). Los niveles plasmáticos de testosterona fueron significativamente mayores en los individuos más jóvenes, y no hubo correlación entre la concentración de testosterona plasmática y de β -NGF ni en PS ni en plasma sanguíneo.

Tabla 4.2. Concentración de β -NGF en PS y plasma sanguíneo (pg/ml) y testosterona en plasma sanguíneo (pg/ml) en conejos de 22 y 37 semanas. Las letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

	Semana 22	Semana 37
β-NGF (pg/ml)		
PS	1378,6 \pm 375,0	1240,3 \pm 270,4
Plasma sanguíneo	658,9 \pm 30,2	746,6 \pm 125,7
Testosterona (pg/ml)		
Plasma sanguíneo	4427,9 \pm 1432,0 ^a	692,1 \pm 201,1 ^b

4 . 2

Producción recombinante de β -NGF de conejo y ensayo de su funcionalidad biológica.

4.2.1. Secuenciación del NGF presente en la próstata de conejo, construcción del plásmido y producción del β -NGF recombinante.

El gen completo de β -NGF junto con la parte pro (Anexo I) se consiguió secuenciar y se publicó en la base de datos de GenBank con el número de acceso KX528686 (Anexo II). El plásmido resultante (pD2539-CEF-NGF) con los genes y el lugar de corte con la enzima de restricción Sall marcados, se muestra en la figura 4.7.

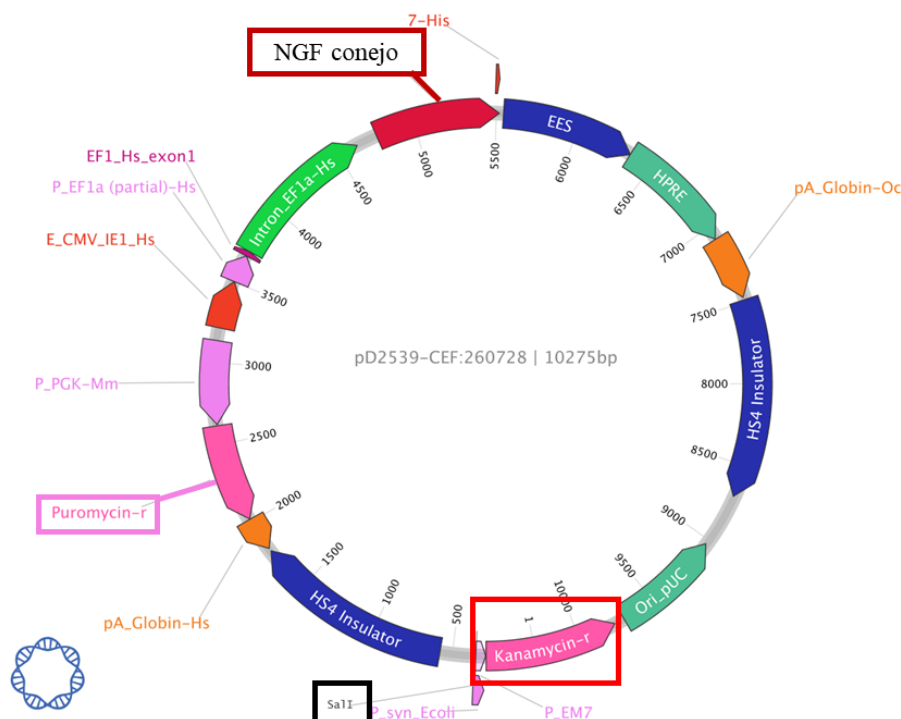


Figura 4.7. Construcción del plásmido que contiene la secuencia de NGF de conejo (empresa DNA 2.0). Están marcados: la secuencia de NGF de conejo con el recuadro rojo oscuro, la secuencia de resistencia a puromicina con el recuadro rosa, la secuencia de resistencia a kanamicina con el recuadro rojo y el sitio de corte con la enzima de restricción Sall con el recuadro negro.

El β -NGF recombinante se expresó en el medio de cultivo libre de proteínas de las células CHO transfectadas con pD2539-CEF-NGF, como se comprobó en el WB (Fig. 4.8A) de dicho medio de cultivo tras su purificación, concentración y diálisis. Se observó una banda de aproximadamente 13-15 kDa, que corresponde a β -NGF. Por otro lado, el análisis de la huella peptídica mediante MALDI-TOF de la banda del SDS-PAGE coincidió con la secuencia insertada en el plásmido correspondiente a la parte beta del NGF (Fig.4.8B).

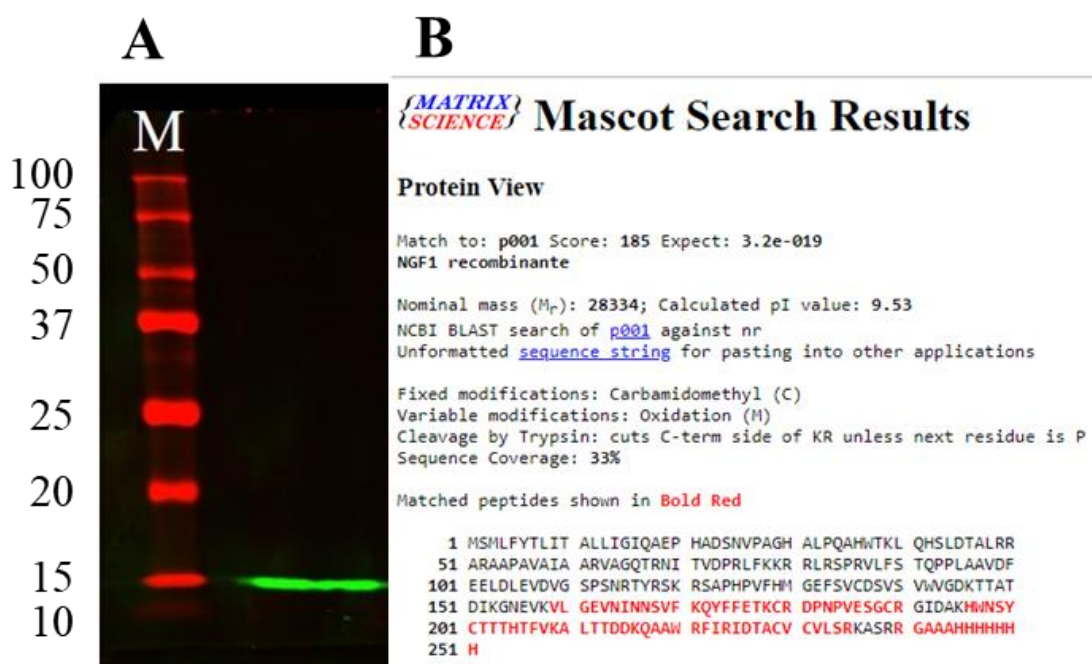


Figura 4.8. A) WB de la proteína recombinante producida en medio de cultivo libre de proteínas. M: marcador de peso molecular (10-250 kDa). B) Resultados de la búsqueda con MASCOT de la proteína detectada mediante MALDI-TOF. En rojo están marcados los aminoácidos que coinciden con la secuencia KX528686, que corresponden a la parte beta de NGF.

4.2.2. Actividad biológica de β -NGF recombinante en células PC12

4.2.2.1. Viabilidad

El análisis de la viabilidad celular mediante MTT fue similar para todas las dosis de β -NGF recombinante testadas (Fig. 4.9), a excepción de la dosis de 100 ng/ml que disminuyó el porcentaje de células viables en comparación con las dosis de 5, 10 y 25 ng/ml ($p < 0,05$).

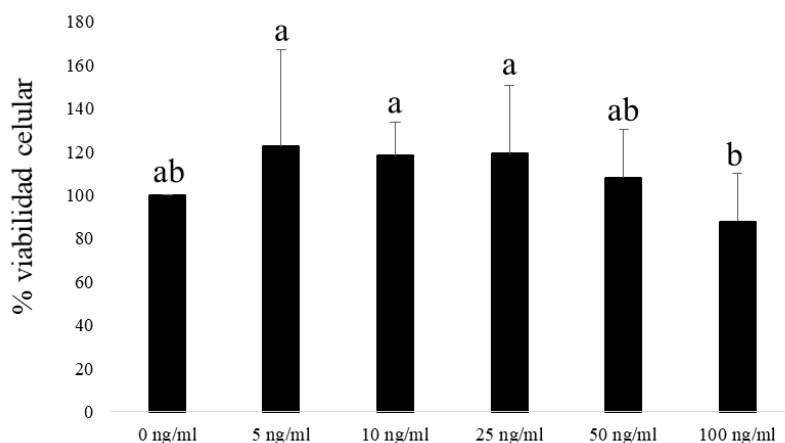


Figura 4.9. Porcentaje de viabilidad celular en células PC12 a las 48 h de la adición de diferentes concentraciones de β -NGF recombinante (0, 5, 10, 25, 50 y 100 ng/ml). Las diferencias significativas entre los grupos están indicadas con letras distintas ($p < 0,05$).

4.2.2.2. Análisis de diferenciación y crecimiento de neuritos

Las células incubadas con β -NGF recombinante presentaron una mayor diferenciación en comparación con el control negativo en todos los días estudiados (Fig. 4.10A, $p < 0,05$). En el día 4 de cultivo, las células tratadas con 25, 50 y 100 ng/ml presentaron los mayores porcentajes de diferenciación, mientras que el grupo con la concentración de 10 ng/ml de β -NGF mostró los menores valores. Estos porcentajes se igualaron en el día 6 de cultivo, y al final del experimento (día 8) las células tratadas con 25, 50 y 100 ng/ml presentaron de nuevo los valores más altos.

Por otro lado, se observaron resultados similares en el día 2 de cultivo con todas las concentraciones estudiadas respecto al porcentaje de células con neuritos (Fig. 4.10B), mientras que en el día 4 los grupos con 5, 25 y 50 ng/ml de β -NGF recombinante presentaron mayores valores que el control negativo. Asimismo, los grupos en los que se adicionaron las concentraciones de 10 y 100 ng/ml de β -NGF recombinante mostraron valores intermedios en ese día. En el día 6, el grupo de 50 ng/ml presentó un mayor porcentaje de células con neuritos con respecto al resto de grupos ($p < 0,05$), mientras que en el día 8 de cultivo, la dosis de 25 ng/ml de β -NGF recombinante fue con la que se obtuvo significativamente mayor porcentaje de células con neuritos seguida de la dosis de 50 ng/ml.

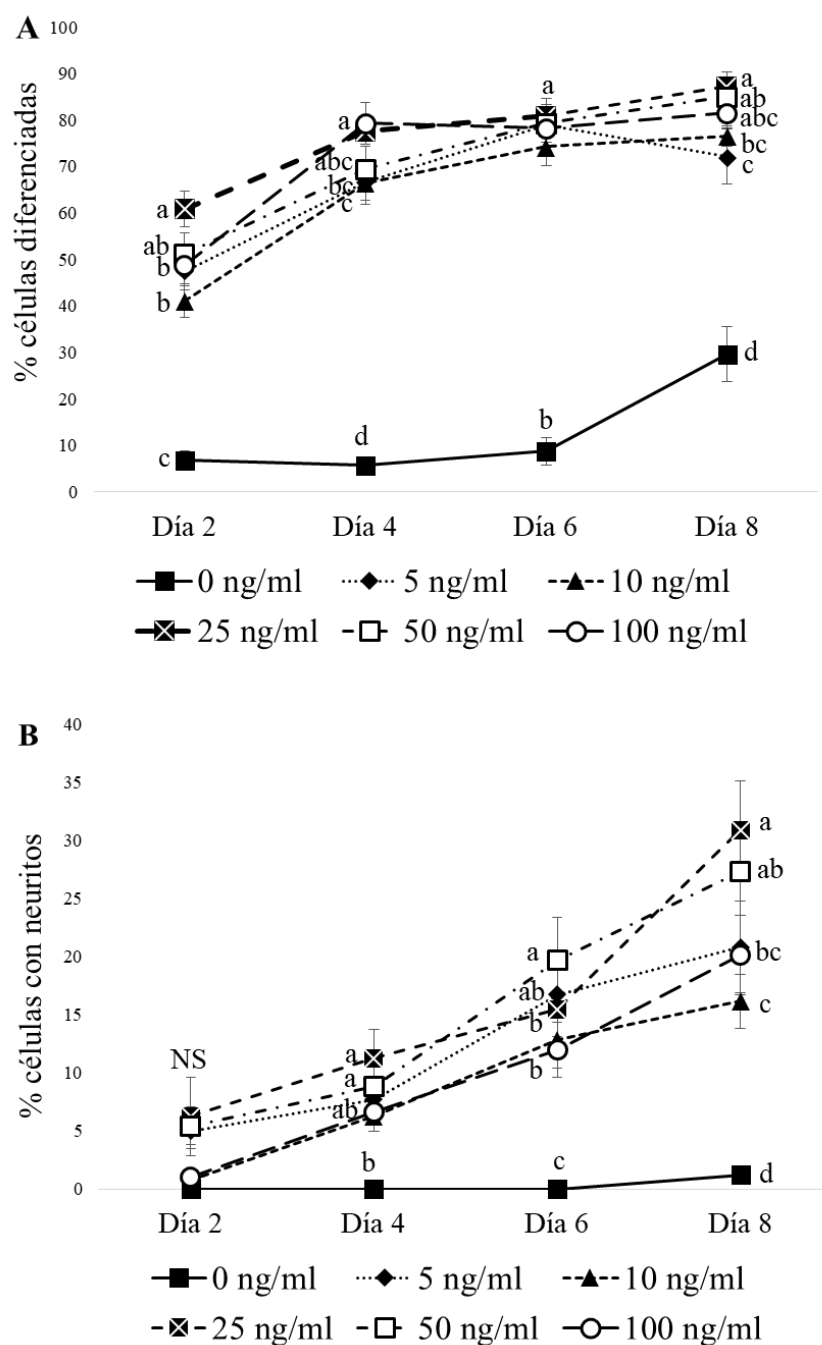


Figura 4.10. Porcentaje de células diferenciadas (A) y de células con neuritos (B) tratadas con diferentes dosis de β -NGF recombinante (0, 5, 10, 25, 50 y 100 ng/ml) durante 8 días. Las diferencias significativas entre los grupos están indicadas con letras distintas ($p < 0,05$). NS: no existen diferencias significativas.

En relación a la longitud de los neuritos, las células tratadas con β -NGF recombinante siempre mostraron una mayor longitud en comparación con el control negativo. Además, la adición de 25 ng/ml a las células supuso un aumento de la longitud de los neuritos en comparación con la de los grupos a los que se adicionaron 5 y 10 ng/ml de β -NGF

recombinante ($p<0,05$). Las concentraciones de 50 y 100 ng/ml presentaron células con neuritos con valores intermedios de longitud (Fig. 4.11).

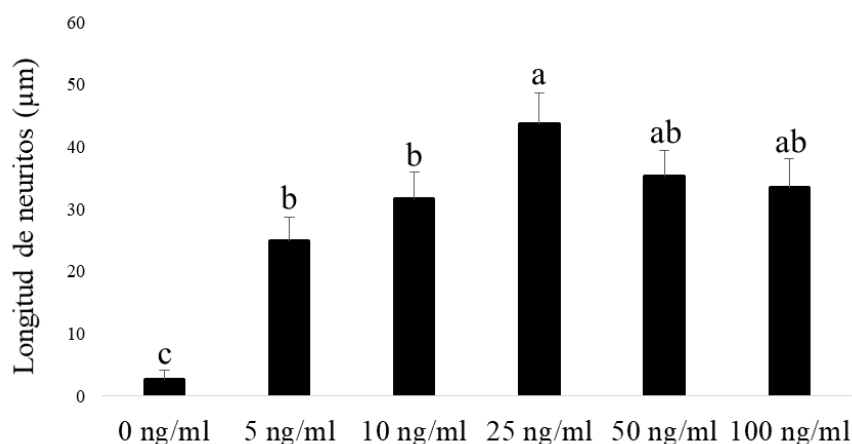


Figura 4.11. Longitud de los neuritos de las células PC12 tratadas con diferentes concentraciones de β -NGF recombinante (0, 5, 10, 25, 50 y 100 ng/ml) a día 8. Las diferencias significativas entre los grupos están indicadas con letras distintas ($p<0,05$).

Para los siguientes ensayos, se utilizó la concentración menor a la cual se producían los mejores resultados de diferenciación, es decir 25 ng/ml.

4.2.2.3. Inmunofluorescencia frente a β -III-tubulina

Las células PC12 tratadas con 25 ng/ml, mostraron inmunofluorescencia positiva en el citoplasma y en los neuritos en el día 8 de tratamiento (Fig. 4.12) mostrando que son células tipo neurona. En el control negativo (células incubadas con PBS en lugar de anticuerpo primario) no apareció tinción fluorescente.

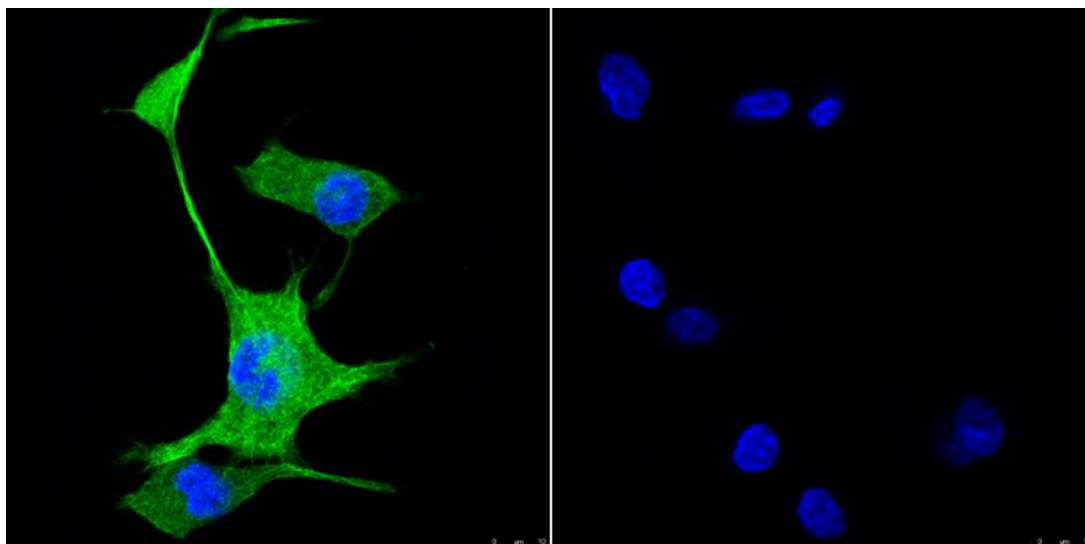


Figura 4.12. *Inmunofluorescencia de células PC12 tras el tratamiento de 8 días con 25 ng/ml de β -NGF recombinante donde se observa: (A) tinción fluorescente verde en el citoplasma y en los neuritos y azul en los núcleos y (B) control negativo (células incubadas con PBS en lugar de anticuerpo primario) en las que sólo se detectó señal azul en los núcleos.*

4.2.2.4. Inhibición del receptor TrkA

En el ensayo de inhibición con K-252a, las células no mostraron diferenciación en el grupo tratado con β -NGF recombinante+K-252a, mientras que en el grupo con 25 ng/ml de β -NGF recombinante y sin inhibidor, apareció un alto porcentaje de diferenciación ($72,21 \pm 1,00\%$), significativamente mayor que en el control negativo ($20,51 \pm 2,81\%$) (Fig. 4.13).

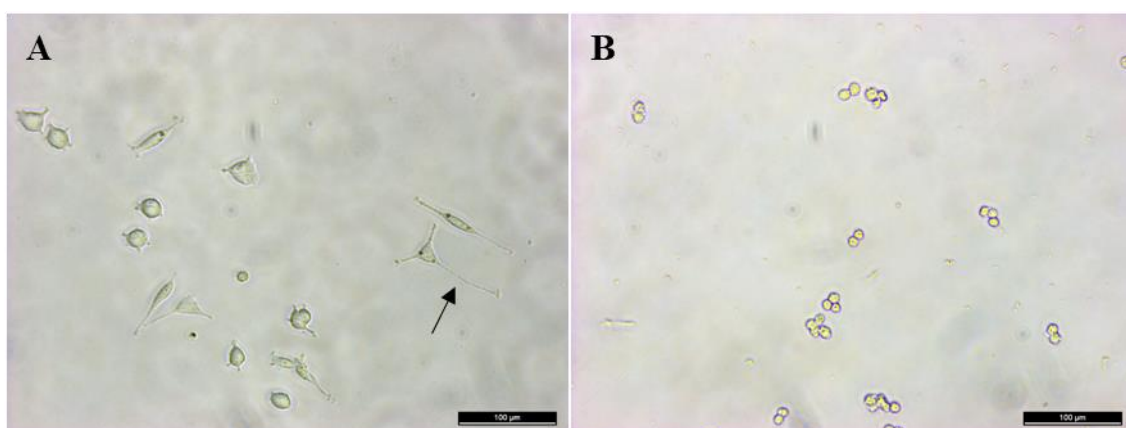


Figura 4.13. *Ensayo de inhibición de TrkA en las células PC12 a las 48 h de cultivo. A) células tratadas con 25 ng/ml β -NGF recombinante. B) células tratadas con 25 ng/ml + K252a. La flecha señala un neurito. Escala de barra: 100 μ m.*

4.2.3. Estudio de la secuencia proteica de β -NGF recombinante en comparación con otras especies

El alineamiento del NGF secuenciado de próstata de conejo con las secuencias proteicas de NGF de otras especies mostró una alta conservación entre secuencias en los sitios de glicosilación de la proteína (Asn⁶⁹, Asn¹¹⁴, Asn¹⁶⁶), en las cisteínas que participan en la formación de los puentes disulfuro (Cys¹³⁶ – Cys²⁰¹, Cys¹⁷⁹ – Cys²²⁹, Cys¹⁸⁹ – Cys²³¹) y en ciertos aminoácidos importantes para la unión a los receptores (Trp¹⁴² e Ile¹⁵²) (Fig. 4.14). En el extremo N-terminal de la región beta del NGF, lugar importante para la unión de TrkA, se detectaron ciertos cambios en los aminoácidos: en las especies de ovulación inducida estudiadas aparecen los aminoácidos alanina-prolina, mientras que en las especies de ovulación espontánea, este par de residuos se cambia por una serina. De manera particular en el conejo, después del tándem alanina-prolina no existe una serina, que sí aparece en el resto de las especies. Por otro lado, la mayoría de los aminoácidos que participan en la unión a p75 están conservados entre especies, excepto una secuencia corta que aparece con dos cambios en conejos (lisina-glicina-**asparragina**-glutámico-valina-**lisina**-valina-leucina) en comparación con el resto de las especies estudiadas (lisina-glicina-**lisina**-glutámico-valina-**metionina**-valina-leucina).

Péptido señal		
NGF_KX528686	MSMLFYTLITALLIGIQAEPHADSNVPAGHALPQAHWTKLQHS LDTALRRARAAPAVAIA	60
IND_Llama_OIF_PS	-----	0
IND_Camelus_dromedarius	MSMLFYTLITALLIGIQAEPHTKSNVPAGHDVPQAHWTKLQHS LDTALRRASAPAGAIA	60
IND_Vicugna_pacos	MSMLFYTLITALLIGIQAEPHTKSNVPAGHDVPQAHWTKLQHS LDTALRRASAPAGAIA	60
IND_Camelus_ferus	MSMLFYTLITALLIGIQAEPHTKSNVPAGHDVPQAHWTKLQHS LDTALRRASAPAGAIA	60
IND_Camelus_bactrianus	MSMLFYTLITALLIGIQAEPHTKSNVPAGHDVPQAHWTKLQHS LDTALRRASAPAGAIA	60
SPONT_Rattus_norvegicus	MSMLFYTLITAFLLIGVQAEPTDSNVPEGDSVPEAHWTKLQHS LDTALRRASAPAEPIA	60
SPONT_Mus_musculus	MSMLFYTLITAFLLIGVQAEPTDSNVPEGDSVPEAHWTKLQHS LDTALRRASAPAEPIA	60
SPONT_Bos_taurus	MSMLFYTLITALLIGIQAEPTESNVPAHAI PQAHWIKLQHS LDTVLRRAHSAPAGPIA	60
SPONT_Homo_sapiens	MSMLFYTLITAFLLIGVQAEPHSESNVPAHGTIPQAHWTKLQHS LDTALRRASAPAAAIA	60
Asn ⁶⁹ Asn ¹¹⁴		
NGF_KX528686	ARVAGQTRNITVDPRLFKKRRRLSPRVLFSTQPPVAADTQDLDEANRAASFNRTHRSK	120
IND_Llama_OIF_SP	-----	0
IND_Camelus_dromedarius	ARVAGQTRNITVDPKLFKKRRRLSPRVLFSTQPPVAADTQDLDEANRAASFNRTHRSK	120
IND_Vicugna_pacos	ARVAGQTRNITVDPKLFKKRRRLSPRVLFSTQPPVAADTQDLDEANRAASFNRTHRSK	120
IND_Camelus_ferus	ARVAGQTRNITVDPKLFKKRRRLSPRVLFSTQPPVAADTQDLDEANRAASFNRTHRSK	120
IND_Camelus_bactrianus	ARVAGQTRNITVDPKLFKKRRRLSPRVLFSTQPPVAADTQDLDEANRAASFNRTHRSK	120
SPONT_Rattus_norvegicus	ARVTGQTRNITVDPKLFKKRRRLSPRVLFSTQPPPTSSDTLDLDFQAHGTISFNTHRSK	120
SPONT_Mus_musculus	ARVTGQTRNITVDPKLFKKRRRLSPRVLFSTQPPPTSSDTLDLDFQAHGTISFNTHRSK	120
SPONT_Bos_taurus	ARVAGQTHNITVDPKLFKKRRRLSPRVLFSTQPPVAADTQDLDFEAGGASSFNTHRSK	120
SPONT_Homo_sapiens	ARVAGQTRNITVDPRLFKKRRRLSPRVLFSTQPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNTHRSK	120
N-terminal Cys ¹³⁶ Trp ¹⁴² Ile ¹⁵² Asn ¹⁶⁶ Phe ¹⁷⁵ Cys ¹⁷⁹		
NGF_KX528686	PSAP-HPVFHMGESVCDVS SVVWGDKTTATD IKGNEVKVLGEVNI NNSVFKQYFFETKC	179
IND_Llama_OIF_SP	--APSHPIFHRG EFSVCDVS SVVWADKTTATD IKGREVMVLGEVNI NNSVFKQYFFETKC	58
IND_Camelus_dromedarius	PSAPSHPIFHRG EFSVCDVS SVVWADKTTATD IKGREVMVLGEVNI NNSVFKQYFFETKC	180
IND_Vicugna_pacos	PSAPSHPIFHRG EFSVCDVS SVVWADKTTATD IKGREVMVLGEVNI NNSVFKQYFFETKC	180
IND_Camelus_ferus	PSAPSHPIFHRG EFSVCDVS SVVWADKTTATD IKGREVMVLGEVNI NNSVFKQYFFETKC	180
IND_Camelus_bactrianus	PSAPSHPIFHRG EFSVCDVS SVVWADKTTATD IKGREVMVLGEVNI NNSVFKQYFFETKC	180
SPONT_Rattus_norvegicus	FSS-THPVFHMGEFSVCDVS SVVWGDKTTATD IKGREVTVLGEVNI NNSVFKQYFFETKC	179
SPONT_Mus_musculus	FSS-THPVFHMGEFSVCDVS SVVWGDKTTATD IKGREVTVLGEVNI NNSVFRQYFFETKC	179
SPONT_Bos_taurus	FSS-SHPVFHRGEFSVCDVS SVVWGDKTTATD IKGREVMVLGEVNI NNSVFKQYFFETKC	179
SPONT_Homo_sapiens	FSS-SHPVFHRGEFSVCDVS SVVWGDKTTATD IKGREVMVLGEVNI NNSVFKQYFFETKC	179
*** ** ***** : ***** : ** ** ***** : *****		
Cys ¹⁸⁹ Cys ²⁰¹ Phe ²⁰⁷ Cys ²²⁹ Cys ²³¹		
NGF_KX528686	RDPNPVESGCRGIDSKHWN SYCTTHTTFVRLTMDGKQAARFIRIDTACVCLSRKASR	239
IND_Llama_OIF_SP	RDPNPVASGCRGIDSKHWN SYCTTHTTFVRLTMDGKQAARFIRIDTACVCLSRKAS-	117
IND_Camelus_dromedarius	RDPNPDES GCRGIDSKHWN SYCTTHTTFVRLTMDGKQAARFIRIDTACVCLSRKAGR	240
IND_Vicugna_pacos	RDPNPDES GCRGIDSKHWN SYCTTHTTFVRLTMDGKQAARFIRIDTACVCLSRKAGR	240
IND_Camelus_ferus	RDPNPDES GCRGIDSKHWN SYCTTHTTFVRLTMDGKQAARFIRIDTACVCLSRKAGR	240
IND_Camelus_bactrianus	RDPNPDES GCRGIDSKHWN SYCTTHTTFVRLTMDGKQAARFIRIDTACVCLSRKAGR	240
SPONT_Rattus_norvegicus	RAPNPVESGCRGIDSKHWN SYCTTHTTFVRLTMDGKQAARFIRIDTACVCLSRKAAR	239
SPONT_Mus_musculus	RASNPNVESGCRGIDSKHWN SYCTTHTTFVRLTMDGKQAARFIRIDTACVCLSRKATR	239
SPONT_Bos_taurus	RDPNPVDSGCRGIDSKHWN SYCTTHTTFVRLTMDGKQAARFIRIDTACVCLSRKTGQ	239
SPONT_Homo_sapiens	RDPNPVDSGCRGIDSKHWN SYCTTHTTFVRLTMDGKQAARFIRIDTACVCLSRKA VR	239
* ** ***** : ***** : ** ** ***** : *****		
NGF_KX528686	RG 241	
IND_Llama_OIF_SP	-- 117	
IND_Camelus_dromedarius	RA 242	
IND_Vicugna_pacos	RA 242	
IND_Camelus_ferus	RA 242	
IND_Camelus_bactrianus	G- 241	
SPONT_Rattus_norvegicus	RG 241	
SPONT_Mus_musculus	RG 241	
SPONT_Bos_taurus	RA 241	
SPONT_Homo_sapiens	RA 241	

Figura 4.14. Alineamiento de la secuencia proteica de NGF de diferentes especies de ovulación inducida (IND, *Oryctolagus cuniculus*, KX528686; OIF de Lama lama, 4EFV_B; *Camelus dromedarius*, XP_010979007.1; *Vicugna pacos*, XP_015102944.1; *Camelus ferus*, XP_006193233.1; *Camelus bactrianus*, XP_010967135.1) y espontánea (SPONT, *Rattus norvegicus*, NP_001263984.1; *Mus musculus*, NP_001106168.1; *Bos Taurus* NP_001092832.1, *Homo sapiens*, NP_002497.2). Se indica el péptido señal, los sitios de glicosilación de pro-NGF (subrayados: N⁶⁹, N¹¹⁴ and N¹⁶⁶), la cadena β (gris claro), las cisteínas de los puentes disulfuro (gris oscuro) y los aminoácidos que participan en la unión con a) TrkA (recuadro), b) p75 (negro) y c) ambos receptores (negrita: Trp¹⁴² e Ile¹⁵²). Las diferencias observadas en la cadena β de NGF están sin subrayar en gris claro.

4.2.4. Efecto de diferentes concentraciones de β -NGF recombinante sobre el semen puro de conejo

La viabilidad espermática y el porcentaje de espermatozoides estáticos (STAT) no se vieron afectados por ninguna de las concentraciones probadas de β -NGF recombinante (0, 2, 20, 100 ng/ml) (Fig. 4.13A). Sin embargo, la dosis 100 ng/ml influyó negativamente sobre los parámetros seminales relacionados con la progresividad del movimiento (NPMOT, Fig. 4.15C; LIN, Fig. 4.15G; STR, Fig. 4.15H; WOB, Fig. 4.15I) a las 2 h del tratamiento al igual que el parámetro VSL. Los parámetros relacionados con la velocidad espermática (VCL y VAP) aumentaron para todas las dosis a las 2 horas.

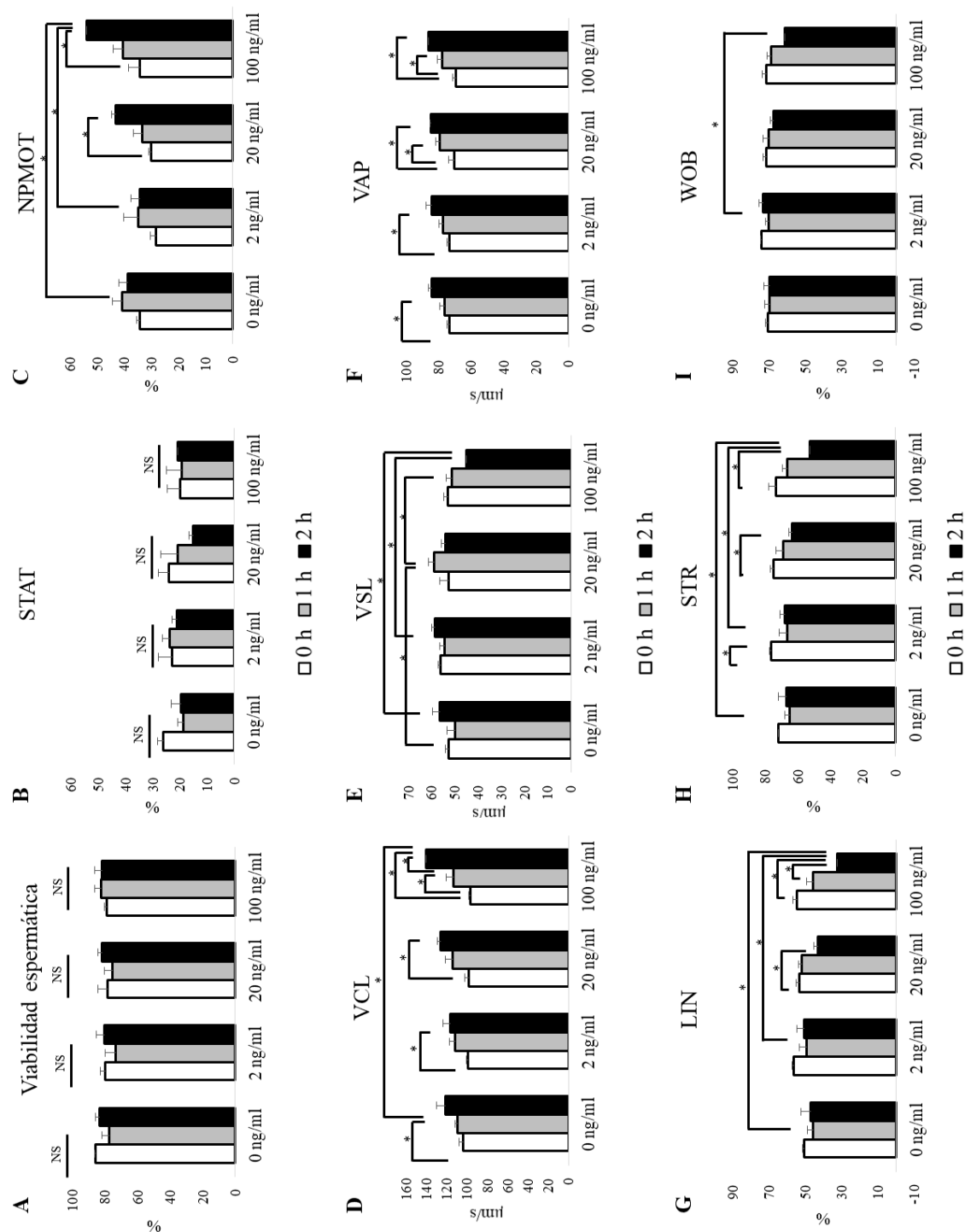


Figura 4.15. Viabilidad espermática (A) y parámetros de motilidad y progresividad espermática analizados mediante el CASA (B-I) a las 0, 1 y 2 h tras la adición de diferentes dosis de β -NGF recombinante (0, 2, 20 y 100 ng/ml). Las diferencias significativas están indicadas mediante * ($p < 0.05$).

4 . 3

Estudio de la inducción de la ovulación con la proteína recombinante β -NGF de conejo adicionada en la dosis de inseminación.

4.3.1. Estudio dosis-respuesta de β -NGF recombinante en semen diluido

La viabilidad espermática de las muestras de semen diluido tratadas con 1 μ g/ml de β -NGF recombinante fue similar al control sin β -NGF, mientras que la viabilidad disminuyó significativamente ($p < 0,05$) en el resto de grupos, sobre todo en aquellos incubados con 20 y 100 μ g/ml (Fig. 4.16A). En estos dos últimos grupos, el porcentaje de espermatozoides estáticos aumentó de forma significativa tras la adición de β -NGF recombinante (Fig. 4.16B).

La motilidad progresiva (PMOT, Fig. 4.16C) y los parámetros de velocidad espermática (VCL, VSL y VAP, Fig. 4.16D-F), se mantuvieron en todos los grupos experimentales excepto en los de las dosis mayores, en los que disminuyó drásticamente.

Por último, los parámetros seminales relacionados con la linealidad, LIN y WOB (Fig. 4.16G y 4.16I) no variaron en los grupos con 20 y 100 ng/ml en relación al control, mientras que el grupo tratado con 1 μ g/ml aumentó; las dosis mayores provocaron una disminución de LIN y WOB ($p < 0,05$). El parámetro STR (Fig. 4.16H) fue similar al control para los grupos en los que se adicionó 100 ng/ml y 1 μ g/ml, mientras que disminuyó en el resto de grupos experimentales.

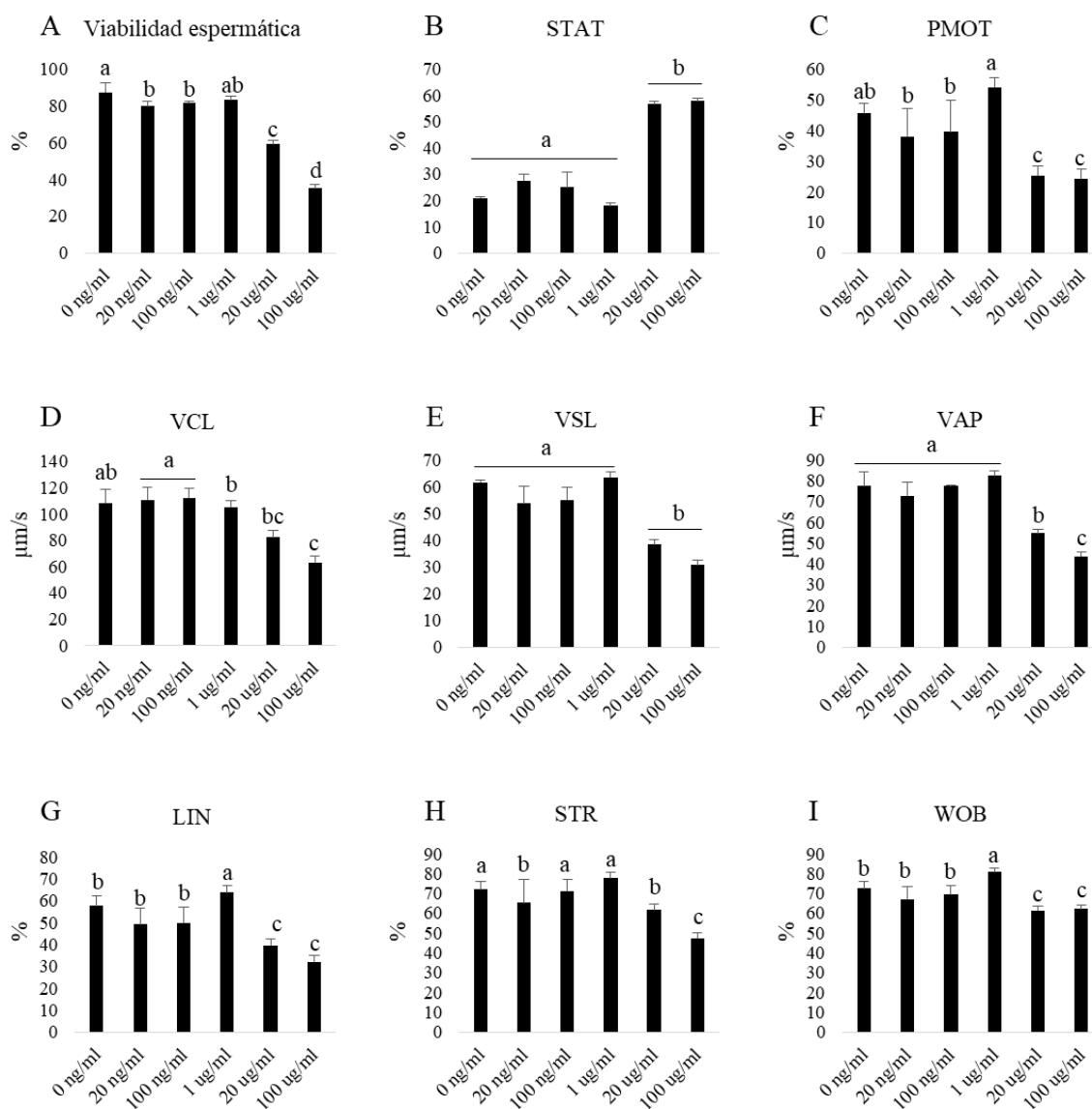


Figura 4.16. Viabilidad espermática (A) y parámetros de motilidad y progresividad espermática analizados mediante el CASA (B-I) tras la adición de diferentes dosis de β -NGF recombinante (0 ng/ml, 20 ng/ml, 100 ng/ml, 1 μ g/ml, 20 μ g/ml y 100 μ g/ml). Las diferencias significativas entre los grupos están indicadas con letras distintas ($p < 0.05$).

4.3.2. Estudio de la inducción de la ovulación con β -NGF recombinante en conejas

La respuesta ovulatoria de las conejas inseminadas con las diferentes concentraciones de β -NGF recombinante (20 ng/ml, 100 ng/ml, 1 μ g/ml, 20 μ g/ml, 100 μ g/ml) adicionado en la dosis seminal fue dependiente de la dosis. La tasa de ovulación del grupo control positivo con hembras tratadas con GnRH intramuscular fue significativamente mayor (10/10, 100%) que la del resto de los grupos experimentales (Fig. 4.17A), seguido del grupo de conejas inseminadas con 1 μ g/ml (6/10, 60%). Las conejas tratadas con 20 μ g/ml

(3/7, 42,9%) y 20 ng/ml (3/10, 30%) presentaron valores intermedios entre el grupo tratado con 1 µg/ml y el control negativo. El resto de grupos presentaron tasas de ovulación similares al control negativo (100 ng/ml: 2/10, 20%; 100 µg/ml: 1/7, 12,5%; control negativo: 1/8, 12,5%).

El número de cuerpos lúteos (CL) de las conejas ovuladas fue similar para todas las hembras tratadas con β-NGF recombinante respecto al control positivo, excepto en el grupo de conejas inseminadas con 100 ng/ml y en la coneja que ovuló del grupo control negativo, que presentaron un mayor número de CL (Fig. 4.17B). En cuanto al número de folículos hemorrágicos, no hubo diferencias entre grupos de tratamiento en las hembras ovuladas ni en las hembras no ovuladas (Fig. 4.17C). Por otro lado, las hembras que ovularon presentaron diferencias en el número de folículos preantrales, siendo mayor este número cuando se administraron las dosis de 1 y 20 µg/ml con respecto a ambos controles; en las hembras no ovuladas no hubo diferencias con respecto a este parámetro (Fig. 4.17D).

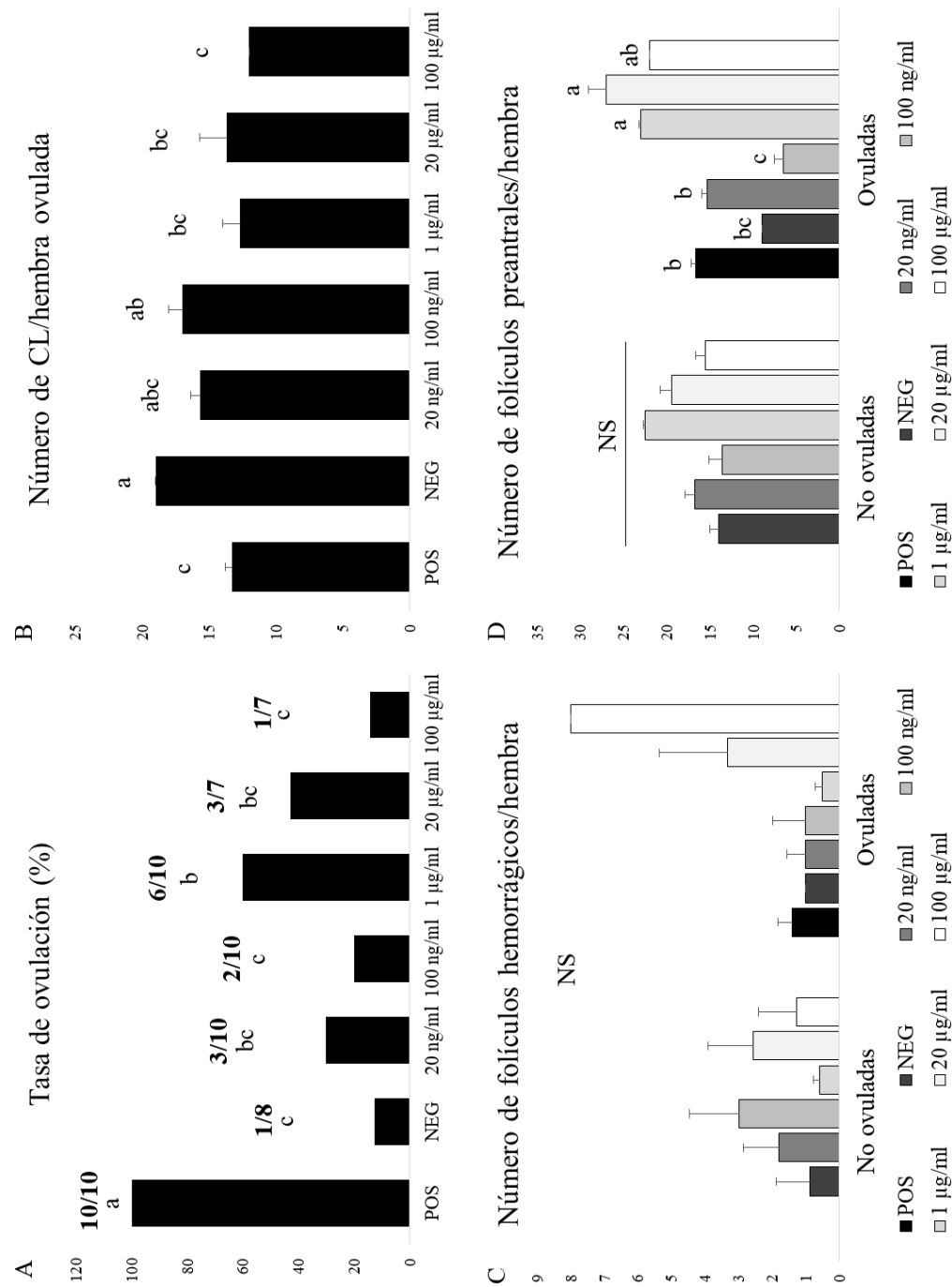


Figura 4.17. Parámetros macroscópicos ováricos tras la administración intravaginal de diferentes dosis de β -NGF recombinante (0 ng/ml, 20 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml, 20 µg/ml y 100 µg/ml). A) Tasa de ovulación. B) Número de cuerpos lúteos por hembra ovulada. C) Número de folículos hemorrágicos por hembra no ovulada y ovulada. D) Número de folículos preantrales por hembra no ovulada y ovulada. Las diferencias significativas entre los grupos están indicadas con letras distintas ($p < 0,05$).

Las concentraciones de LH se mantuvieron en niveles basales en las hembras que no ovularon (Fig. 4.18A), mientras que en el grupo de hembras ovuladas, se pudo apreciar un pico de LH que aumentó a los 30 min post-IA y fue disminuyendo hasta pasados los 120 min en las hembras del control positivo. En los grupos tratados con β -NGF recombinante, los niveles de LH comenzaron a aumentar a los 60 min, apareciendo los valores más elevados en el grupo inseminado con 20 μ g/ml, seguido del de 20 ng/ml y 1 μ g/ml (Fig 4.18B). A los 120 min post-IA, los niveles de LH continuaron aumentando en los grupos con β -NGF recombinante, siendo el de 20 μ g/ml el mayor seguido del tratado con 1 y 100 μ g/ml.

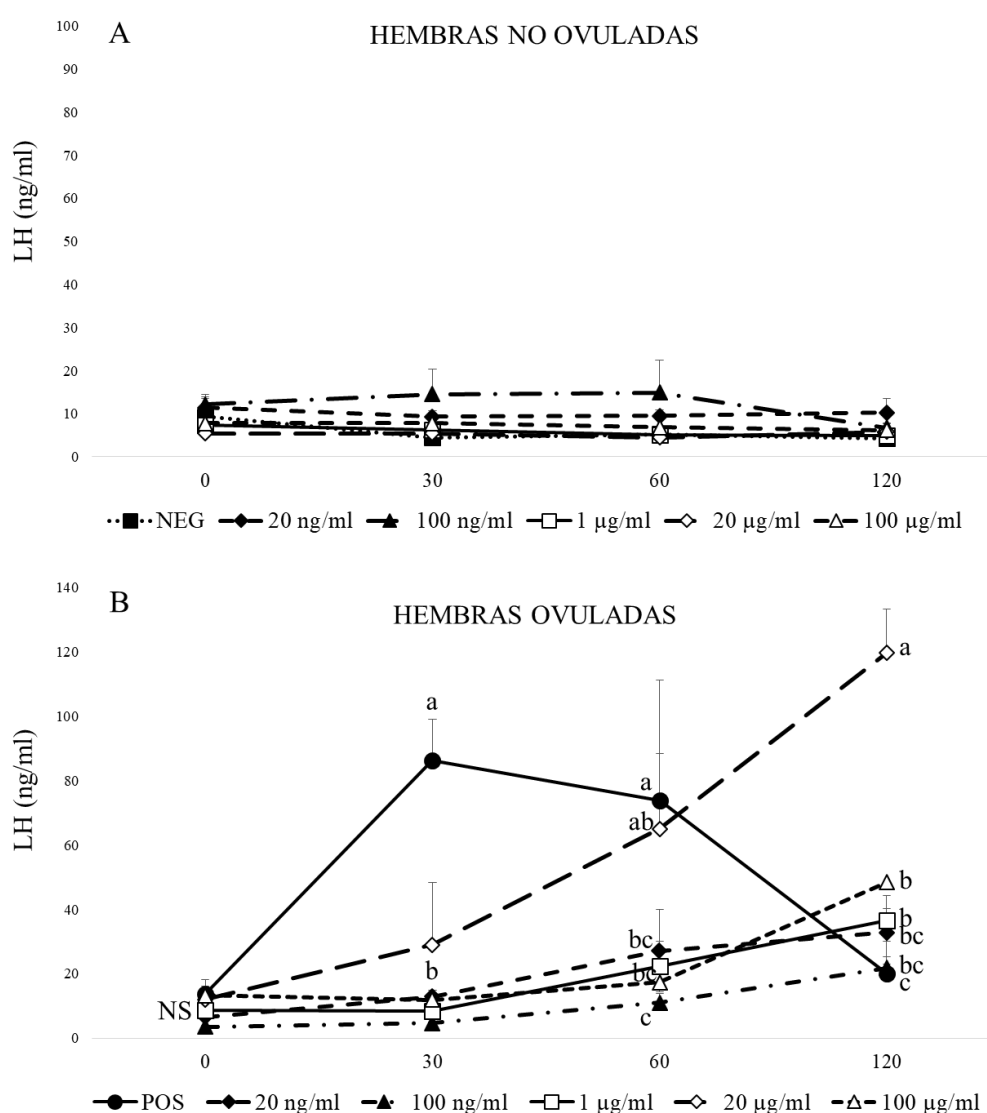


Figura 4.18. Concentraciones de LH en conejas ovuladas (A) y no ovuladas (B) a los 0, 30, 60 y 120 min tras la IA. 1) β -NGF recombinante (0 ng/ml, 20 ng/ml, 100 ng/ml, 1 μ g/ml, 20 μ g/ml y 100 μ g/ml) vía intravaginal, 2) 20 μ g de GnRH vía intramuscular (control positivo) o 3) con cánula y sin semen (control negativo). Las diferencias significativas entre los grupos están indicadas con letras distintas ($p < 0,05$).

Los niveles de progesterona fueron similares entre el día 0 y el 7 en las hembras que no ovularon (Fig. 4.19A), mientras que en las conejas ovuladas, se produjo un aumento en el día 7 post-IA en aquellas tratadas con las dosis menores (20 y 100 ng/ml y 1 µg/ml) de β -NGF recombinante frente a las inseminadas con las dosis de 20 y 100 µg/ml (Fig. 4.19B). Además, las concentraciones de progesterona en el día 7 se mantuvieron en niveles similares a los del control positivo para las hembras ovuladas de los grupos 20 y 100 ng/ml y 100 µg/ml.

Todas las hembras que ovularon (26/62) presentaron vesículas embrionarias en los cuernos uterinos excepto la coneja que ovuló del grupo tratado con 100 µg/ml.

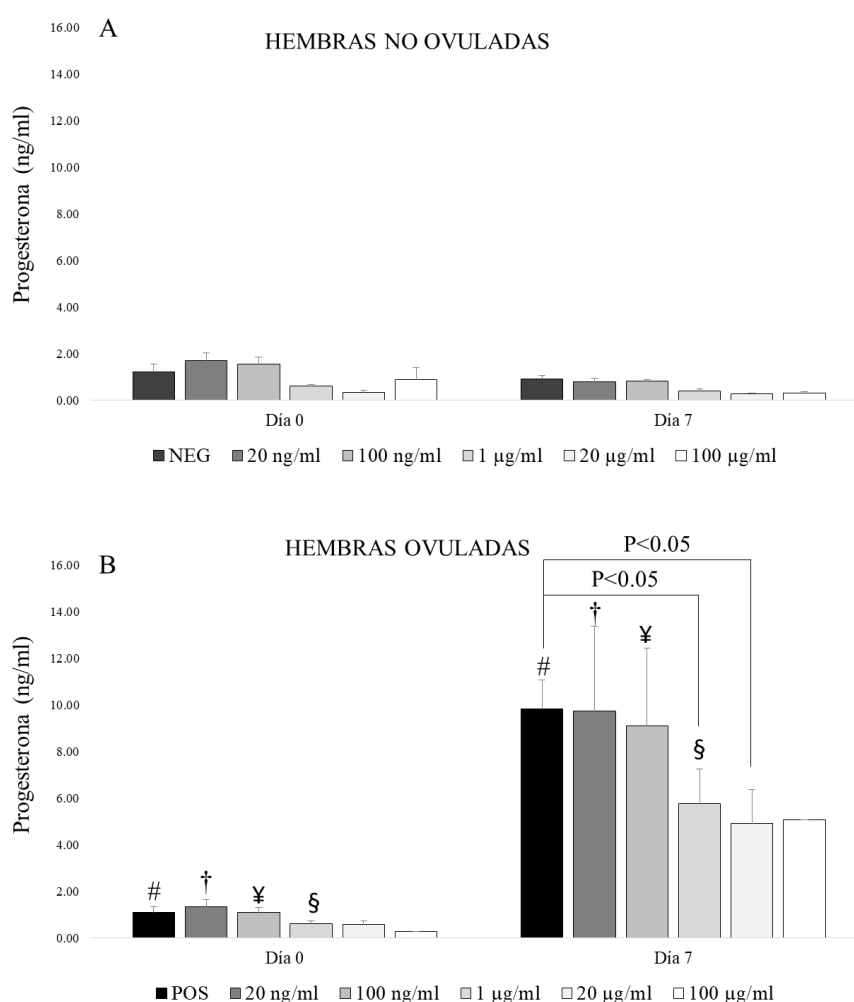


Figura 4.19. Concentraciones de LH en conejas ovuladas (A) y no ovuladas (B) a los 0, 30, 60 y 120 min tras la IA. 1) β -NGF recombinante (0 ng/ml, 20 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml, 20 µg/ml y 100 µg/ml) vía intravaginal, 2) 20 µg de GnRH vía intramuscular (control positivo) o 3) con cánula y sin semen (control negativo). Las letras distintas en un mismo tiempo indican diferencias entre grupos de tratamiento ($p<0,05$).

5. DISCUSIÓN

El factor de crecimiento nervioso (β -NGF) se localiza en el aparato reproductor y está implicado en importantes funciones sobre los gametos y funciones reproductivas esenciales, como la ovulación. Los conejos presentan el sistema β -NGF (constituido por el β -NGF y sus receptores TrkA y p75) en el tracto reproductor masculino (testículos, próstata y glándulas seminales) (Maranesi *et al.*, 2015, García-García *et al.*, 2018a) y femenino (ovarios, oviducto, útero y cérvix) (Maranesi *et al.*, 2016, Maranesi *et al.*, 2018, García-García *et al.*, 2018b), poniendo en evidencia la implicación de este sistema en la reproducción de esta especie.

Los estudios que se presentan en esta memoria han ido encaminados a investigar en profundidad las particularidades del sistema β -NGF en los conejos, caracterizándolo en el tracto reproductor masculino durante la madurez sexual (objetivo 1) y produciendo β -NGF recombinante homólogo (objetivo 2) para analizar los efectos *in vitro* sobre gametos masculinos (objetivos 2 y 3) e *in vivo* sobre la ovulación de conejas (objetivo 3).

Para comprobar la expresión génica y la inmunolocalización de β -NGF y de sus dos receptores durante el periodo de madurez sexual nos hemos centrado en dos órganos: la glándula bulbouretral y el epidídimo, que no se habían descrito anteriormente en el conejo, y los hemos relacionado con la expresión y localización en la próstata, la cual se ha descrito en conejos adultos como una fuente abundante de β -NGF (Harper y Thoenen 1980, Maranesi *et al.*, 2015, García-García *et al.*, 2018a). La madurez sexual, período en el cual se logra la producción máxima de espermatozoides (Lebas *et al.*, 1996), no tiene lugar hasta las 28-32 semanas (Lebas *et al.*, 1996, García-Tomás *et al.*, 2009) en conejos. Este período es crítico para el estudio de la expresión génica de proteínas que pueden participar en el desarrollo del individuo y no se ha estudiado específicamente en otras especies, ya que las investigaciones se centran principalmente en periodos perinatales (Djakiew, 1992, Djakiew *et al.*, 1994, Cupp *et al.*, 2000). En este sentido, sólo hemos hallado un estudio, en alpacas, que compara la expresión génica de β -NGF en testículos entre animales en edad postnatal (1 mes) y en edad puberal (12 y 24 meses). Así, parece que el β -NGF participa en el desarrollo testicular no sólo en individuos neonatos, sino también durante la fase de madurez sexual (Wang *et al.*, 2011). En nuestros estudios, la expresión génica tanto de la neurotrofina como de sus dos receptores, permanecieron constantes a lo largo del periodo de tiempo estudiado, indicando que la expresión de este sistema no parece repercutir de una manera directa en el proceso de maduración sexual.

En el presente estudio, la próstata fue el tejido que mostró una mayor expresión de ARNm de β -NGF para ambas edades, distando en gran medida del resto de tejidos analizados (epidídimo y glándulas bulbouretrales), lo que confirma los resultados anteriormente descritos en esta especie en conejos adultos (Maranesi *et al.*, 2015, Garcia-Garcia *et al.*, 2018a). Recientemente, se ha publicado que la cantidad de β -NGF producido en las glándulas accesorias puede variar en función de la especie (Bogle *et al.*, 2018). En algunas de ellas, la próstata es la fuente principal (*llamas y alpacas*: Bogle *et al.*, 2018; *humanos*: Djakiew *et al.*, 1992, Guate *et al.*, 1999, Satoh *et al.*, 2001; *cobaya*: Shikata *et al.*, 1984, MacGrogan *et al.*, 1991; *ratón*: MacGrogan *et al.*, 1991; *rata*: MacGrogan *et al.*, 1991, Li *et al.*, 2005, Squillacioti *et al.*, 2009) mientras que en bóvidos la fuente principal de β -NGF es la glándula vesicular y la ampolla, y en alces, la ampolla (Bogle *et al.*, 2018).

En cuanto a la inmunolocalización de β -NGF en la próstata, se encontraron diferencias entre las dos edades estudiadas. En edades más tempranas, la neurotrofina se localizó con mayor intensidad en la zona apical de las células epiteliales mientras que, en los machos maduros sexualmente, el β -NGF se distribuyó por todo el citoplasma celular, lo que indica la posible síntesis y almacenamiento de β -NGF. Además, se observó una tinción negativa en el tejido intersticial de la próstata, lo que sugiere que este tejido no suministra β -NGF a las células epiteliales, al igual que ocurre en humanos (Satoh *et al.*, 2001). Por otro lado, la glándula bulbouretral y el epidídimo no parecen colaborar en la producción de β -NGF en el conejo, ya que su expresión es baja en relación a la próstata y su localización se limita al tejido intersticial de la glándula bulbouretral, de acuerdo con Harper y Thoenen (1980), los cuales detectaron una baja cantidad de neurotrofina en glándulas bulbouretrales por radioinmunoensayo.

Por tanto, la expresión junto con la inmunolocalización de β -NGF en las células epiteliales de la próstata, pone en evidencia la participación de este tejido en la síntesis, almacenamiento y secreción de esta neurotrofina durante el proceso de la madurez sexual. Las diferencias en la distribución en las células epiteliales de la próstata sugieren una secreción de β -NGF distinta entre las dos edades, aunque no se ha traducido en un aumento de la concentración del factor en el PS, ya que nuestros resultados muestran unos niveles constantes durante el periodo estudiado. Por consiguiente, es posible que el β -NGF secretado en edades tempranas se almacene en el tracto genital y contribuya al desarrollo del tejido prostático (Djakiew 1992) o a la mejora de los parámetros seminales

como la concentración o la motilidad espermáticas (Jin et al 2010, Li et al 2010, Shi et al 2012, Lin et al 2015, Saeednia 2015, 2016) mediante mecanismos autocrinos o paracrinos (Djakiew 1992, Perrard et al 2007), ya que estos parámetros se mejoraron en nuestro trabajo a lo largo del desarrollo del animal.

Por otro lado, los receptores de β -NGF de alta afinidad, TrkA, y de baja afinidad, p75, se expresaron de manera constante durante el periodo estudiado en todos los tejidos evaluados, aunque se hallaron ciertas diferencias entre los receptores en cuanto a su inmunolocalización. Así, en la próstata, la localización de p75 fue escasa y heterogénea en las células epiteliales mientras que la tinción de TrkA en las membranas de estas células fue intensa y de manera similar en ambas edades, lo cual pone de manifiesto que este órgano responde a β -NGF durante la madurez sexual, de una manera probablemente auto/paracrina con el β -NGF producido en la próstata (Squillacioti *et al.*, 2009). Además, el citoplasma de las células epiteliales de las glándulas bulbouretrales mostró una señal intensa para ambos receptores en ambas edades, lo que conduce a suponer que pueden interaccionar con el β -NGF producido en la próstata. Estas glándulas se encargan de secretar el fluido encargado de neutralizar la acidez del ambiente uretral y de proteger a los gametos masculinos (Chughtai *et al.*, 2005).

Además, la presencia de TrkA en el tejido intersticial tanto de próstata como de glándula bulbouretral sugiere la participación de este tejido en la provisión del receptor a los órganos mencionados, no siendo de la misma manera para el receptor de baja afinidad, que no mostró tinción en el tejido intersticial.

Respecto al epidídimo, se inmunolocalizaron ambos receptores en la cabeza y cola siendo la tinción de TrkA más homogénea e intensa en el epitelio y en el intersticio. Un hallazgo común a ambos receptores, no descrito previamente, fue la localización de TrkA y p75 en los estereocilios en la cabeza del epidídimo en ambas edades. Recientemente, se ha hallado también tinción de NGF en los estereocilios de rata (Bogle *et al.*, 2018). Estos son prolongaciones de la membrana de las células epiteliales del epidídimo y su cometido es asegurar una concentración espermática correcta. Asimismo, a medida que los espermatozoides atraviesan el epidídimo, experimentan una serie de transformaciones necesarias para adquirir una motilidad adecuada (Ayer-LeLievre *et al.*, 1988). En este sentido, la presencia con mayor intensidad en la cabeza epididimaria de ambos receptores en los estereocilios sugiere una posible implicación del β -NGF en la adquisición de una concentración y motilidad de los espermatozoides adecuadas durante la madurez sexual,

lo que concuerda con la mejoría en los resultados de estos parámetros que se obtuvieron en los individuos de mayor edad en nuestro estudio de la calidad seminal. Por otro lado, puesto que el epidídimo es el órgano encargado de la maduración y migración espermáticas (revisado por Sullivan y Mieusset., 2016), la presencia de los dos receptores en el epidídimo sugiere también que la neurotrofina al unirse a estos está implicada, al menos en parte, en estas funciones.

Por otra parte, la concentración de β -NGF en el PS y en el plasma sanguíneo permaneció constante a lo largo del tiempo estudiado. En toros, se han relacionado mayores concentraciones de β -NGF con la calidad del semen (Parthipan *et al.*, 2017), y en humanos, está también demostrado que el sistema β -NGF/TrkA influye en las características seminales (Li *et al.*, 2010, Lin *et al.*, 2015). En el caso de los camélidos, se postula que la cantidad de β -NGF en el eyaculado pueda estar relacionada con la fertilidad (Bogle *et al.*, 2018). En nuestro trabajo, los parámetros seminales evaluados mejoran en los individuos de más edad, como ya se ha mencionado, por lo que no parece haberse visto influido por los niveles circulantes de β -NGF en plasma sanguíneo. Asimismo, los niveles de β -NGF no se correlacionaron con los niveles plasmáticos de testosterona, lo cual indica que la secreción de β -NGF es independiente de andrógenos, como ocurre en ratas (Squillacioti *et al.*, 2009, Persson *et al.*, 1990, Lonnerberg *et al.*, 1992) y en cobayas (MacGrogan *et al.*, 1991). Los niveles de β -NGF en el PS obtenidos en la presente tesis doctoral (aproximadamente 2 ng/ml) son similares a los obtenidos en conejos adultos por otros autores (Maranesi *et al.*, 2015, Casares-Crespo *et al.*, 2018a), aunque difieren con otro estudio reciente (Maranesi *et al.*, 2018) en el que hallaron unos niveles de 150 μ g/ml. Los niveles en sangre de β -NGF no concuerdan tampoco con los publicados anteriormente (Maranesi *et al.*, 2015). Estas diferencias pueden deberse probablemente a las distintas técnicas o *kits* comerciales utilizados.

En base a los resultados relacionados con el objetivo 1, se puede concluir que el sistema β -NGF está presente en el tracto reproductor masculino de conejos desde el periodo peripuberal hasta la madurez, con una expresión génica mantenida en el tiempo y con diferencias en la localización en los tejidos que pueden estar relacionadas con la mejora de ciertos parámetros seminales como la concentración o la motilidad espermáticas a lo largo del tiempo, lo que indicaría su papel en la maduración espermática. La secreción de β -NGF en el PS y en la sangre se mantiene constante durante la madurez sexual y es independiente de los niveles de testosterona, por lo que es probable que no esté

relacionado con la fertilidad, aunque se necesitarían más estudios para descartar esta hipótesis.

Con el fin de profundizar en el estudio de β -NGF en conejos, hemos producido β -NGF recombinante y hemos realizado un análisis de su secuencia proteica en comparación con la de otras especies de ovulación inducida y espontánea. De esta manera, pudimos comprobar si la proteína homóloga era capaz de provocar la ovulación en conejas. La producción recombinante de β -NGF (β -NGF recombinante) se realizó a partir de la secuencia de próstata de conejo determinada en nuestro laboratorio mediante técnicas especializadas de RACE (Frohman *et al.*, 1988), la cual se publicó en GenBank (número de acceso KX528686, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/kx528686>). Esta secuencia se insertó en un plásmido, se transfectó en células de ovario de hámster chino (CHO), y se purificó en columnas de níquel a partir del medio de cultivo celular, lo que nos permitió obtener la proteína. Una vez verificado su peso molecular mediante WB y confirmada su secuencia proteica por técnicas de espectrometría de masas (MALDI-TOF), comprobamos que la actividad biológica en células PC12 (Greene and Tischler, 1976) era correcta. El estudio dosis-respuesta mostró que para todas las concentraciones testadas de β -NGF recombinante (5, 10, 25, 50 y 100 ng/ml), las células mantuvieron su viabilidad con respecto al control sin β -NGF recombinante, lo cual indica que la proteína recombinante no tiene efecto tóxico a las concentraciones estudiadas. En cambio, la diferenciación celular varió según la dosis aplicada, presentando mejores resultados las dosis intermedias (25 y 50 ng/ml) en cuanto a porcentaje de células diferenciadas (pérdida de forma circular de la célula), porcentaje de células con neuritos y media de la longitud de los neuritos. Estos datos contrastan con lo descrito por Gunning *et al.* (1981) que encontraron que la dosis de 150 ng/ml de β -NGF recombinante de origen murino producía un incremento del porcentaje de células con neuritos mayor que otras dosis menores. Estas diferencias pueden ser debidas al origen de las proteínas recombinantes, que interactúan con células PC12 de rata, ya que su diferenciación celular puede variar dependiendo de la especie por diferente afinidad de la proteína con el receptor TrkA (Katzir *et al.* 2003). Los análisis de bloqueo del receptor TrkA con el antagonista específico K-252a, que no produjo diferenciación en ninguna de las dosis aplicadas, junto con la inmunofluorescencia positiva de las PC12 diferenciadas con el anticuerpo β -III tubulina, específico de neuronas, verificaron la correcta actividad biológica de la proteína recombinante producida.

Posteriormente, se analizó la secuencia de aminoácidos de β -NGF recombinante para compararla con las secuencias publicadas en el NCBI de otras especies de ovulación inducida [llama (*Lama lama*), camello (*Camelus dromedarius*, *Camelus bactrianus*, *Camelus ferus*), alpaca (*Vicugna pacos*)] y espontánea [rata (*Rattus norvegicus*), ratón (*Mus musculus*), toro (*Bos taurus*), humano (*Homo sapiens*)]. Una de las diferencias notables entre las secuencias de especies de ovulación inducida y espontánea se encontró en la región N-terminal del β -NGF, importante para la unión con el receptor de alta afinidad. Mientras que en las secuencias de las especies de ovulación espontánea aparecen los aminoácidos serina y serina/treonina, en las especies de ovulación inducida se encuentran los residuos alanina-prolina-serina. La prolina es un aminoácido con una estructura especial, ya que es el único aminoácido que contiene el carbono α incluido en un anillo; esto implica una torsión en la proteína que varía su estructura terciaria (Bachmann 1978). La presencia de este aminoácido en las especies de ovulación inducida y en una región importante para la unión a TrkA nos permite postular que existen variaciones moleculares en la unión al receptor debidas a la torsión que implica la prolina; esto puede ocasionar diferentes niveles de intensidad en la unión a TrkA. También en la región N-terminal aparece una particularidad únicamente en conejos: la serina que sigue a los aminoácidos citados anteriormente en el resto de especies, desaparece en el conejo, lo cual puede ser relevante para que la configuración formada por la prolina sea más estable. Por otro lado, se han encontrado mutaciones también en sitios que se consideran de reconocimiento del receptor de baja afinidad según Fahnestock *et al.*, (2004), como la lisina (K) sustituida por asparragina (N) y la metionina (M) conservada en el resto de las especies, que queda reemplazada por una lisina, de tal manera que la secuencia de aminoácidos de esta región varía de KGKEVMV a KGNEVKV en conejo. La carga positiva de la lisina está desplazada en el caso del conejo, lo cual puede implicar un cambio en la proximidad de la unión entre el β -NGF y el p75, ya que en este lugar de la secuencia del receptor aparece una histidina cargada positivamente, que repele a la lisina. Estos cambios en la secuencia de β -NGF de conejo en los lugares de unión a los receptores, sin embargo, no parecen influir de manera determinante en la acción biológica de la neurotrofina en llamas, donde se ha comprobado que el OIF es β -NGF (Ratto *et al.*, 2012) y que la administración intramuscular de PS de conejo produce la ovulación en el 100% de las hembras, resultados similares a los que aparecen cuando se utiliza PS homólogo (Silva *et al.*, 2011). Por el contrario, el PS de llama no consigue producir la ovulación en conejas (Silva *et al.*, 2011), en base a lo cual podemos postular que los

residuos que varían en la secuencia proteica del β -NGF de conejo pueden ser de gran importancia para la unión a los receptores en el conejo, confiriéndole en parte las características fisiológicas particulares en la reproducción de esta especie, ya que la fisiología reproductiva de camélidos y conejos varía en el momento del coito. Además, cabe destacar que el PS se compone de numerosos compuestos que podrían participar también en la ovulación, por lo que serían necesarios más estudios para esclarecer estas suposiciones; por ejemplo, utilizar β -NGF recombinante de conejo y de camélidos de manera heteróloga en ambas especies para determinar el efecto individual de la neurotrofina, o realizar estudios moleculares, como la cristalización de la unión de β -NGF de conejos y camélidos junto con sus dos receptores para observar posibles mutaciones en los receptores, como se ha descrito en humanos (Ultsch *et al.*, 1999, He y García, 2004, Wehrmann *et al.*, 2007).

Una vez sintetizada la proteína recombinante de conejo, antes de aplicarla en la dosis seminal para inducir la ovulación, comprobamos que la proteína no provocaba toxicidad en los espermatozoides ni afectaba al semen entero de conejo. Las concentraciones que se testaron fueron 2 ng/ml, concentración fisiológica según nuestros análisis previos en PS, 20 ng/ml y 100 ng/ml. Todas ellas mantuvieron la viabilidad espermática durante las 2 h del estudio, hecho que confirma que el β -NGF recombinante no producía un efecto tóxico en el semen a estas concentraciones. Por otro lado, respecto al efecto que produce el β -NGF, se ha descrito en otras especies que su adición modifica los parámetros seminales. Así, en espermatozoides humanos, donde se ha demostrado la existencia del receptor TrkA (Li *et al.*, 2010a), concentraciones de 1 y 10 μ M con 1 h de incubación resultan en una mejora de los parámetros de motilidad y velocidad (Shi *et al.*, 2012, Lin *et al.*, 2015). En espermatozoides de toro, donde también se ha encontrado el receptor presente en la cabeza y cola espermáticas (Li *et al.*, 2010b), la adición exógena de β -NGF produce un incremento en la viabilidad y no afecta a otros parámetros como la actividad mitocondrial o la reacción acrosómica (Li *et al.*, 2010b). En nuestro estudio, los parámetros de motilidad y velocidad espermáticos no variaron con respecto al control en el momento de la adición de β -NGF recombinante de acuerdo a lo observado en semen de hámster dorado tratado con 100 ng/ml de β -NGF (Jin *et al.*, 2010).

Sin embargo, tras 2 h de incubación, se observó que la dosis más alta provocaba una reducción de la progresividad espermática, evidenciado en el mayor porcentaje de espermatozoides con motilidad no progresiva, en la disminución de parámetros

relacionados con la linealidad del movimiento del espermatozoide y en la disparidad en los parámetros relacionados con la velocidad del espermatozoide (mayor VCL y menor VSL), cuando estos dos parámetros suelen variar de manera directamente proporcional.

La dosis para producir la ovulación cuando se emplean análogos de GnRH administrados por vía intravaginal se ha calculado que es unas 10 veces mayor de la utilizada por vía intramuscular (Quintela *et al.*, 2004; Viudes-de-Castro *et al.*, 2007; Rebollar *et al.*, 2012; Dal Bosco *et al.*, 2014). En este trabajo, con el fin de cubrir el rango de las concentraciones publicadas de β -NGF en PS (desde aproximadamente 2 ng/ml a 150 μ g/ml), y teniendo en cuenta que la absorción de la mucosa intravaginal es menor que la de otras vías (intravenosa e intramuscular), las dosis empleadas fueron desde 20 ng/ml hasta 100 μ g/ml. De este modo, primeramente se valoró la adición de 5 concentraciones diferentes de β -NGF recombinante en semen diluido a la dilución final de la dosis de IA (1:10, v:v): 20 y 100 ng/ml y 1, 20 y 100 μ g/ml de β -NGF recombinante. En este caso, las concentraciones mayores de 20 y 100 μ g/ml repercutieron negativamente en la viabilidad y en todos los parámetros seminales de motilidad y velocidad estudiados. Estos resultados sugieren que quizás a altas concentraciones de β -NGF, la unión de la neurotrofina con ambos receptores desencadena mecanismos celulares proapoptóticos (Tometten *et al.*, 2005), que se desarrollarían debido a que las concentraciones distan en gran medida de las fisiológicas detectadas en nuestro laboratorio y en estudios anteriores (Maranesi *et al.*, 2015, Casares-Crespo *et al.*, 2018a). En cambio, las concentraciones más bajas (20 ng/ml, 100 ng/ml y 1 μ g/ml) mantuvieron los parámetros seminales a niveles similares a los del control negativo (sin β -NGF recombinante), acorde con lo encontrado en toros a concentraciones de 80 a 120 ng/ml (Li *et al.*, 2010b). Es de remarcar que se observó una mejora en algunos de los parámetros relacionados con la motilidad espermática (LIN y WOB) con la concentración de 1 μ g/ml de β -NGF recombinante.

En el estudio *in vivo*, se testaron las mismas dosis de β -NGF recombinante añadidas al semen diluido, ya que se desconocía si β -NGF era capaz de inducir la ovulación en conejas y la dosis necesaria para desarrollar este efecto. Estudios previos, realizados por nosotros, utilizando dosis de 24 μ g/ml de β -NGF murino presentaron bajas tasas de ovulación. Por ello, probamos incluso las dosis más altas, a pesar de los efectos negativos que supusieron en el semen diluido, puesto que una vez llegada la dosis seminal a la vagina, las concentraciones de β -NGF podrían diluirse más. Los resultados obtenidos demostraron que la proteína recombinante β -NGF recombinante es capaz de producir la

ovulación en conejas según la dosis aplicada, acorde con estudios previos en llamas y en alpacas (Tanco *et al.*, 2011, Silva *et al.*, 2011, Ulloa-Leal *et al.*, 2014, Stuart *et al.*, 2015). En otras especies, se han obtenido diferentes tasas de ovulación tras la administración intrauterina de PS homólogo (alpacas: Ratto *et al.*, 2005; llamas: Silva *et al.*, 2017a) o β -NGF purificado de PS (llamas: Silva *et al.*, 2015; Berland *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2017a). La máxima tasa de ovulación en nuestro estudio se alcanzó en el grupo tratado con GnRH intramuscular (100%, control positivo), mientras que el grupo de conejas inseminadas con 1 μ g/ml de β -NGF recombinante en la dosis seminal mostró un porcentaje de ovulación del 60%, obteniendo valores intermedios las conejas de los grupos de 20 ng/ml (30%) y 20 μ g/ml (42,5%). Los otros dos grupos obtuvieron tasas de ovulación que no difirieron del control negativo (100 ng/ml: 20% y 100 μ g/ml: 14,3%). Es de remarcar que sólo una hembra del grupo control negativo ovuló, lo que es debido probablemente al estímulo mecánico de la cánula, que por sí solo es capaz de provocar la ovulación en conejas (Rebollar *et al.*, 2012). Las conejas del grupo del control positivo con GnRH alcanzaron el pico de LH a los 30-60 minutos tras la IA de acuerdo a estudios previos (Rebollar *et al.*, 2012). Sin embargo, en las hembras que ovularon de los grupos inseminados con β -NGF recombinante en la dosis seminal, el aumento de LH plasmática se retrasó, comenzando a ascender a los 120 min, alcanzando el mayor valor en el grupo tratado con 20 μ g/ml; aun así, los niveles de LH de las hembras tratadas con β -NGF recombinante alcanzaron valores similares a los descritos en la bibliografía (García-García *et al.*, 2018, Maranesi *et al.*, 2018). Este retraso en el pico de la LH en hembras tratadas con β -NGF ya ha sido descrito en camélidos (Tanco *et al.*, 2011, Silva *et al.*, 2011, Ulloa-Leal *et al.*, 2014) y el motivo por el que sucede es incierto, aunque Adams y colaboradores (2016) sugieren que se debe a la existencia de pasos intermedios en la ruta que sigue el β -NGF (por ejemplo, tipos celulares diferentes que responden a β -NGF) para provocar la liberación de GnRH/LH. Estos resultados abren nuevas perspectivas para optimizar la dosis de β -NGF recombinante necesaria para provocar tasas de ovulación similares a las obtenidas con análogos de la GnRH.

En cualquier caso, a pesar del retraso en el pico de LH, el β -NGF recombinante alcanzó los niveles óptimos de LH para que los folículos pudieran ovular y luteinizarse, lo que se evidenció en el escaso número de folículos hemorrágicos, en el número de cuerpo lúteo (CL) que fue igual o significativamente mayor que en el control positivo. Este efecto luteotrófico se ha descrito tras la administración intramuscular de OIF/ β -NGF en llamas

(Tanco *et al.*, 2011, Stuart *et al.*, 2015, Ulloa-Leal *et al.*, 2014, Fernández *et al.*, 2014, Silva *et al.*, 2017b) y en vacas (Tribulo *et al.*, 2015). Por otro lado, en estudios previos del grupo y de otros autores, la administración intramuscular de β -NGF de origen murino (García-García *et al.*, 2018a) o de PS homólogo (Silva *et al.*, 2011) produjo bajos porcentajes de ovulación en conejas, aunque se observó un incremento de folículos hemorrágicos y folículos preantrales en comparación con el grupo control positivo. Los resultados del presente trabajo reafirman este efecto foliculoestimulante a partir de las dosis de 1 μ g/ml. En vista a estos resultados, es posible que los estrógenos procedentes de los folículos estimulados faciliten el mantenimiento de la gestación, ya que son capaces de reforzar la acción luteotrófica necesaria durante las primeras etapas de la gestación (Miller y Toft, 1983). Los niveles de progesterona, elevados en el día 7 de gestación, y la presencia de vesículas embrionarias en el tracto uterino, ponen de manifiesto el buen funcionamiento de los CL presentes y sugieren que el β -NGF recombinante no afecta a la fertilidad ni al desarrollo embrionario temprano, de acuerdo con investigaciones previas realizados en condiciones *in vitro* (Pei, 2010).

Los resultados relacionados con el tercer objetivo demuestran que el β -NGF recombinante se puede absorber por vía vaginal en conejas y que puede producir la ovulación, hecho constatado anteriormente en llamas y en alpacas (Ratto *et al.*, 2005, Silva *et al.*, 2017). Aunque no se conoce detalladamente el mecanismo por el que se lleva a cabo, el β -NGF presente en el PS se podría absorber en la mucosa vaginal y alcanzar el flujo sanguíneo para llegar al hipotálamo, donde se uniría a neuronas de kisspeptina, activando las neuronas de GnRH (El Allali *et al.*, 2017). En los camélidos, se ha planteado que la ruta predominante que utiliza el β -NGF para provocar la ovulación es a través de la circulación sistémica, comparada con la actuación a nivel local (Ratto *et al.*, 2005). Sin embargo, en los conejos, la respuesta ovulatoria es nula (Silva *et al.*, 2011) o muy reducida (García-García *et al.* 2018) cuando se administra por vía intramuscular. En este sentido, recientemente se ha propuesto una hipótesis (Maranesi *et al.*, 2018), en la que se postula que tras la administración intravaginal de semen puro, el β -NGF presente en el semen junto con el β -NGF sintetizado por el útero, actuarían de manera paracrina en las células del cérvix y útero, estimulando la síntesis de prostaglandinas. Estas incrementarían la vascularización uterina, permitiendo el paso de β -NGF a la circulación para alcanzar los ovarios, realizando una acción directa en ellos, ya que presentan receptores en sus estructuras (Maranesi *et al.*, 2018, García-García *et al.*, 2018b). Por otro

lado, el β -NGF llegaría al hipotálamo vía sistémica favoreciendo el pico de LH. Asimismo, junto con el propio mecanismo endocrino, en conejas es importante el estímulo vagino-cervical, que puede ocasionar la ovulación. Un mecanismo novedoso que proponen Maranesi *et al.* (2018) es que el β -NGF se une a sus receptores presentes en el útero o el cérvix y pueden llegar al centro hipotalámico a través de las vías aferentes de la médula espinal. Sin embargo, estos estudios se han realizado con el semen puro y no con β -NGF, y por ello no se puede determinar con seguridad que el β -NGF sea el responsable de los efectos propuestos, ya que el PS está compuesto por muchas moléculas que podrían contribuir por sí mismas o de manera sinérgica al efecto inductor de la ovulación.

Resumiendo los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, podemos afirmar que el sistema β -NGF está presente en el aparato reproductor masculino de los conejos desde la peripubertad hasta la madurez sexual, con una distribución diferencial que concuerda con la mejora en los parámetros de calidad seminal durante esta etapa, aunque las concentraciones de β -NGF en sangre y en PS se mantienen constantes y no parecen depender de los niveles plasmáticos de testosterona. Por otro lado, se ha producido por primera vez, un β -NGF recombinante a partir de la secuencia de próstata de conejo que presenta actividad biológica en células PC12. Asimismo, se han descrito variaciones en la secuencia de la proteína del conejo que podrían ayudar a explicar alguna de sus particularidades fisiológicas. Además, se ha comprobado que este β -NGF recombinante no tiene efectos negativos en el semen de conejo cuando se añade a concentraciones próximas a las fisiológicas y que, añadido en la dosis de inseminación, es capaz de provocar la ovulación de manera dosis-dependiente en las conejas. Todo ello abre nuevas perspectivas en la inducción de la ovulación en explotaciones cunícolas, que pueden implicar una mejora en el bienestar animal al sustituir la administración parenteral de análogos de la GnRH por la administración de β -NGF recombinante en la dosis de inseminación.

6 . CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral se han podido extraer las siguientes conclusiones que responden a los objetivos planteados inicialmente:

1. El factor de crecimiento nervioso (β -NGF) y sus dos receptores (TrkA y p75) tienen una expresión génica constante durante la madurez sexual en el tracto reproductor masculino del conejo. Los niveles de β -NGF en el plasma sanguíneo y en el plasma seminal se mantienen constantes desde la peripubertad a la madurez sexual y no se correlacionan con los niveles de testosterona.
2. El sistema β -NGF presenta una inmunolocalización variable en el tracto genital del conejo dependiendo del órgano y de la edad del animal.
3. El β -NGF recombinante producido a partir de la secuencia genética de próstata de conejo es biológicamente activo.
4. La secuencia proteica del β -NGF recombinante de conejo en comparación con otras especies de ovulación inducida y espontánea presenta ciertos cambios en residuos relacionados con la unión a sus receptores.
5. El β -NGF recombinante es capaz de inducir la ovulación en conejas vía intravaginal de una manera dosis-dependiente a concentraciones de entre 20 ng/ml y 100 μ g/ml, desencadenando efectos luteotróficos y folículoestimulantes, sin afectar negativamente a la fertilidad de la coneja.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams GP, Ratto MH, Huanca W and Singh J. 2005. *Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas*. *Biology of Reproduction* 73: 452-457.

Adams GP, Ratto MH, Silva ME and Carrasco RA. 2016. *Ovulation-inducing factor (OIF/NGF) in seminal plasma: a review and update*. *Reproduction in Domestic Animals* 51 (Suppl 2): 4-17.

Adams TE and Boime I. 2008. *The expanding role of recombinant gonadotropins in assisted reproduction*. *Reproduction in Domestic Animals* 43 (Suppl 2): 186-192.

Aloe L and Chaldakov GN. 2013. *The multiple life of nerve growth factor: tribute to Rita Levi-Montalcini (1909-2012)*. *Balkan Medical Journal* 30: 4-7.

Amann RP and Waberski D. 2014. *Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments*. *Theriogenology* 81: 5-17.

Ambriz D, Rosales AM, Sotelo R, Mora JA, Rosado A and Garcia AR. 2002. *Changes in the quality of rabbit semen in 14 consecutive ejaculates obtained every 15 minutes*. *Archives of Andrology* 48(5): 389-395.

Arias-Alvarez M, Garcia-Garcia RM, Torres-Rovira L, Gonzalez-Bulnes A, Rebollar PG and Lorenzo PL. 2010. *Influence of leptin on in vitro maturation and steroidogenic secretion of cumulus-oocyte complexes through JAK2/STAT3 and MEK 1/2 pathways in the rabbit model*. *Reproduction* 139(3): 523-532.

Ayer-LeLievre C, Olson L, Ebendal T, Hallbook F and Persson H. 1988. *Nerve growth factor mRNA and protein in the testis and epididymis of mouse and rat*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(8): 2628-2632.

Bachmann K. 1978. *Biología para médicos: conceptos básicos para las facultades de medicina, farmacia y biología* (versión española). Eds. Reverte S. A. Barcelona.

Bakker J and Baum MJ. 2000. *Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators*. *Frontiers in Neuroendocrinology* 21(3): 220-262.

Bao L, Li Q, Liu Y, Li B, Sheng X, Han Y and Weng Q. 2014. *Immunolocalization of NGF and its receptors in ovarian surface epithelium of the wild ground squirrel during the breeding and nonbreeding seasons*. *European Journal of Histochemistry* 58 (2363): 127-131.

- Barde YA**, Edgar D and Thoenen H. 1982. *Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain*. The European Molecular Biology Organization Journal 1(5): 549-553.
- Berland MA**, Ulloa-Leal C, Barria M, Wright H, Dissen GA, Silva ME, Ojeda SR and Ratto MH. 2016. *Seminal Plasma Induces Ovulation in Llamas in the Absence of a Copulatory Stimulus: Role of Nerve Growth Factor as an Ovulation-Inducing Factor*. Endocrinology 157(8): 3224-3232.
- Bigon E**, Soranzo C, Minozzi C, Skaper SD and Callegaro L. 1990. *Large scale purification and immunological characterization of human placental nerve growth factor*. Neurochemical Research 15(12): 1197-1202.
- Bogle OA**, Carrasco RA, Ratto MH, Singh J and Adams GP. 2018. *Source and localization of ovulation-inducing factor/nerve growth factor in male reproductive tissues among mammalian species*. Biology of Reproduction. In press, <https://doi.org/10.1093/biolre/ioy149>.
- Boiti C**, Guelfi G, Zampini D, Brecchia G, Gobbetti A and Zerani M. 2003. *Regulation of nitric oxide synthase isoforms and role of nitric oxide during prostaglandin F2alpha-induced luteolysis in rabbits*. Reproduction 125(6): 807-816.
- Bothwell M**. 2014. *NGF, BDNF, NT3, and NT4*. Handbook of Experimental Pharmacology 220: 3-15.
- Bothwell M**. 2016. *Recent advances in understanding neurotrophin signaling*. F1000Research, Faculty of 1000 faculty reviews (1885): 1-9.
- Bradford MM**. 1976. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Bradshaw RA**, Pundavela J, Biarc J, Chalkley RJ, Burlingame AL and Hondermarck H. 2015. *NGF and ProNGF: Regulation of neuronal and neoplastic responses through receptor signaling*. Advances in Biological Regulation 58: 16-27.
- Brauer MM**, Shockley KP, Chavez R, Richeri A, Cowen T and Crutcher KA. 2000. *The role of NGF in pregnancy-induced degeneration and regeneration of sympathetic nerves in the guinea pig uterus*. Journal of the Autonomic Nervous System 79 (1): 19-27.

- Bromfield JJ.** 2016. *A role for seminal plasma in modulating pregnancy outcomes in domestic species*. *Reproduction* 152(6): 223-232.
- Bruce G and Heinrich G.** 1989. *Production and characterization of biologically active recombinant human nerve growth factor*. *Neurobiology of Aging* 10(1): 89-94.
- Bueker E.** 1948. *Implantation of tumors in the hind limb field of the embryonic chick and the developmental response of the lumbosacral nervous system*. *The Anatomical Record* 102(3): 369-389.
- Caporali A and Emanuelli C.** 2009. *Cardiovascular actions of neurotrophins*. *Physiological Reviews* 89(1): 279-308.
- Carrasco R, Singh J and Adams GP.** 2016. *The dynamics of trkA expression in the bovine ovary are associated with a luteotrophic effect of ovulation-inducing factor/nerve growth factor (OIF/NGF)*. *Reproductive Biology and Endocrinology* 14(1): 47(1-11).
- Casares-Crespo L, Fernandez-Serrano P, Vicente JS, Marco-Jimenez F and Viudes-de-Castro MP.** 2018a. *Rabbit seminal plasma proteome: The importance of the genetic origin*. *Animal Reproduction Science* 189: 30-42.
- Casares-Crespo L, Fernandez-Serrano P, Vicente JS, Moce E, Castellini C, Stabile AM and Viudes-de-Castro MP.** 2018b. *Insemination extender supplementation with bestatin and EDTA has no effect on rabbit reproductive performance*. *Theriogenology* 105: 61-65.
- Castellini C.** 2008. *Semen production and management of rabbit bucks*. *Proceedings of 9th World Rabbit Congress, Reproduction*: 265-278.
- Chen BX, Yuen ZX and Pan GW.** 1985. *Semen-induced ovulation in the bactrian camel (Camelus bactrianus)*. *Journal of Reproduction and Fertility* 74(2): 335-339.
- Cho ES, Yi JM, Park JS, Lee YJ, Lim CJ, Bang OS and Kim NS.** 2016. *Aqueous extract of Lithospermum radix attenuates oxaliplatin-induced neurotoxicity in both in vitro and in vivo models*. *BioMed Central Complementary and Alternative Medicine* 16(1): 419 (1-13).
- Chughtai B, Sawas A, O'Malley RL, Naik RR, Ali Khan S and Penttyala S.** 2005. *A neglected gland: a review of Cowper's gland*. *International Journal of Andrology* 28(2): 74-77.

Clegg DO, Large TH, Bodary SC and Reichardt LF. 1989. *Regulation of nerve growth factor mRNA levels in developing rat heart ventricle is not altered by sympathectomy*. Developmental Biology 134(1): 30-37.

Cohen S and Levi-Montalcini R. 1956. *A Nerve Growth-stimulating Factor isolated from snake venom*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 42(9): 571-574.

Colangelo AM, Finotti N, Ceriani M, Alberghina L, Martegani E, Aloe L, Lenzi L and Levi-Montalcini R. 2005. *Recombinant human nerve growth factor with a marked activity in vitro and in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(51): 18658-18663.

Cordeiro ML, Umbach JA and Gundersen CB. 2000. *Lithium ions enhance cysteine string protein gene expression in vivo and in vitro*. Journal of Neurochemistry 74(6): 2365-2372.

Cupp AS, Kim GH and Skinner MK. 2000. *Expression and action of neurotrophin-3 and nerve growth factor in embryonic and early postnatal rat testis development*. Biology of Reproduction 63(6): 1617-1628.

Dal Bosco A, Rebollar PG, Boiti C, Zerani M and Castellini C. 2011. *Ovulation induction in rabbit does: current knowledge and perspectives*. Animal Reproduction Science 129(3-4): 106-117.

Dal Bosco A, Cardinali R, Brecchia G, Rebollar PG, Fatnassi M, Millan P, Mattioli S and Castellini C. 2014. *Induction of ovulation in rabbits by adding Lecirelin to the seminal dose: in vitro and in vivo effects of different excipients*. Animal Reproduction Science 150(1-2): 44-49.

Das KP, Freudenrich TM and Mundy WR. 2004. *Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures*. Neurotoxicology and Teratology 26(3): 397-406.

Davies AM, Thoenen H and Barde YA. 1986. *The response of chick sensory neurons to brain-derived neurotrophic factor*. The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience 6(7): 1897-1904.

Dees WL, Hiney JK, Schultea TD, Mayerhofer A, Danilchik M, Dissen GA and Ojeda SR. 1995. *The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factor receptors*. Endocrinology 136(12): 5760-5768.

Dissen GA, Hill DF, Costa ME, Ma YJ and Ojeda SR. 1991. *Nerve growth factor receptors in the peripubertal rat ovary*. Molecular Endocrinology 5(11): 1642-1650.

Dissen GA, Hirshfield AN, Malamed S and Ojeda SR. 1995. *Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: changes at the time of folliculogenesis*. Endocrinology 136(10): 4681-4692.

Dissen GA, Romero C, Hirshfield AN and Ojeda SR. 2001. *Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary*. Endocrinology 142(5): 2078-2086.

Dissen GA, Garcia-Rudaz C, Paredes A, Mayer C, Mayerhofer A and Ojeda SR. 2009. *Excessive ovarian production of nerve growth factor facilitates development of cystic ovarian morphology in mice and is a feature of polycystic ovarian syndrome in humans*. Endocrinology 150(6): 2906-2914.

Djakiew D, Delsite R, Pflug B, Wrathall J, Lynch JH and Onoda M. 1991. *Regulation of growth by a nerve growth factor-like protein which modulates paracrine interactions between a neoplastic epithelial cell line and stromal cells of the human prostate*. Cancer Research 51(12): 3304-3310.

Djakiew D. 1992. *Role of nerve growth factor-like protein in the paracrine regulation of prostate growth*. Journal of Andrology 13(6): 476-487.

Djakiew D, Pflug B, Dionne C and Onoda M. 1994. *Postnatal expression of nerve growth factor receptors in the rat testis*. Biology of Reproduction 51(2): 214-221.

Druart X, Rickard JP, Mactier S, Kohnke PL, Kershaw-Young CM, Bathgate R, Gibb Z, Crossett B, Tsikis G, Labas V, Harichaux G, Grupen CG and de Graaf SP. 2013. *Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma*. Journal of Proteomics 91: 13-22.

Edwards RH, Selby MJ, Mobley WC, Weinrich SL, Hruby DE and Rutter WJ. 1988. *Processing and secretion of nerve growth factor: expression in mammalian cells with a vaccinia virus vector*. Molecular and Cellular Biology 8(6): 2456-2464.

El Allali K, El Bousmaki N, Ainani H and Simonneaux V. 2017. *Effect of the Camelid's Seminal Plasma Ovulation-Inducing Factor/beta-NGF: A Kisspeptin Target Hypothesis*. Frontiers in Veterinary Science 4: 99(1-12).

Ernfors P, Ebendal T, Olson L, Mouton P, Stromberg I and Persson H. 1989. *A cell line producing recombinant nerve growth factor evokes growth responses in intrinsic and grafted central cholinergic neurons*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86(12): 4756-4760.

Fahnestock M, Yu G, Michalski B, Mathew S, Colquhoun A, Ross GM and Coughlin MD. 2004. *The nerve growth factor precursor proNGF exhibits neurotrophic activity but is less active than mature nerve growth factor*. Journal of Neurochemistry 89(3): 581-592.

Frohman MA, Dush MK and Martin GR. 1988. *Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 85(23): 8998-9002.

Garcia-Garcia RM, Masdeu MdM, Sanchez-Rodriguez A, Millan P, Arias-Alvarez M, Sakr OG, Bautista JM, Castellini C, Lorenzo PL and Rebollar PG. 2018a. *β -nerve growth factor identification in male rabbit genital tract and seminal plasma and its role in ovulation induction in rabbit does*. Italian Journal of Animal Science 17(2): 442-453.

Garcia-Garcia RM, Arias-Alvarez M, Sanchez-Rodriguez A, Rebollar PG, Lorenzo PL. 2018b. *NGF system is differentially expressed in the ovary, oviduct and uterus of rabbit does although independent of serum hormonal levels*. Proceedings of 22nd Annual ESDAR Conferences.

Gentry JJ, Barker PA and Carter BD. 2004. *The p75 neurotrophin receptor: multiple interactors and numerous functions*. Progress in Brain Research 146: 25-39.

Gholami Tilko P, Hajihassan Z and Moghimi H. 2017. *Optimization of recombinant beta-NGF expression in Escherichia coli using response surface methodology*. Preparative Biochemistry and Biotechnology 47(4): 406-413.

Gifre L, Aris A, Bach A and Garcia-Fruitos E. 2017. *Trends in recombinant protein use in animal production*. Microbial Cell Factories 16(1): 40(1-17).

- Goldstein LD**, Reynolds CP and Perez-Polo JR. 1978. *Isolation of human nerve growth factor from placental tissue*. *Neurochemical Research* 3(2): 175-183.
- Gonzales GF**. 2001. *Function of seminal vesicles and their role on male fertility*. *Asian Journal of Andrology* 3(4): 251-258.
- Gonzalez-Cadavid V**, Martins JA, Moreno FB, Andrade TS, Santos AC, Monteiro-Moreira AC, Moreira RA and Moura AA. 2014. *Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters*. *Theriogenology* 82(5): 697-707.
- Götz R**, Köster R, Winkler C, Raulf F, Lottspeich F, Scharl M and Thoenen H. 1994. *Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family*. *Nature* 372(6503): 266-269.
- Grau CM and Greene LA**. 2012. *Use of PC12 cells and rat superior cervical ganglion sympathetic neurons as models for neuroprotective assays relevant to Parkinson's disease*. *Methods in Molecular Biology* 846: 201-211.
- Greene LA and Tischler AS**. 1976. *Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73(7): 2424-2428.
- Guate JL**, Fernandez N, Lanzas JM, Escaf S and Vega JA. 1999. *Expression of p75 (LNGFR) and Trk neurotrophin receptors in normal and neoplastic human prostate*. *BJU International* 84(4): 495-502.
- Gunning PW**, Landreth GE, Layer P, Ignatius M and Shooter EM. 1981. *Nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells: evaluation of changes in RNA and DNA metabolism*. *Journal of Neuroscience* 1(14): 368-379.
- Haas AJ**, Prigent S, Dutertre S, Le Dréan Y and Le Page Y. 2016. *Neurite analyzer: An original Fiji plugin for quantification of neuritogenesis in two-dimensional images*. *Journal of Neuroscience Methods* 271: 86-91.
- Hakola K**, Boogaart PV, Mulders J, de Leeuw R, Schoonen W, Heyst JV, Swolfs A, Casteren JV, Huhtaniemi I and Kloosterboer H. 1997. *Recombinant rat luteinizing hormone; production by Chinese hamster ovary cells, purification and functional characterization*. *Molecular and Cellular Endocrinology* 128(1-2): 47-56.

- Hallböök F**, Ebendal T and Persson H. 1988. *Production and characterization of biologically active recombinant beta nerve growth factor*. Molecular and Cellular Biology 8(1): 452-6.
- Hamburger V and Levi-Montalcini R**. 1949. *Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions*. Journal of Experimental Zoology 111(3): 457-501.
- Harper GP**, Glanville RW and Thoenen H. 1982. *The purification of nerve growth factor from bovine seminal plasma. Biochemical characterization and partial amino acid sequence*. The Journal of Biological Chemistry 257(14): 8541-8548.
- Harper GP and Thoenen H**. 1980. *The distribution of nerve growth factor in the male sex organs of mammals*. Journal of Neurochemistry 34(4): 893-903.
- Harrington AW**, Leiner B, Blechschmitt C, Arevalo JC, Lee R, Morl K, Meyer M, Hempstead BL, Yoon SO and Giehl KM. 2004. *Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(16): 6226-6230.
- He XL and Garcia KC**. 2004. *Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75*. Science 304(5672): 870-875.
- Heinrich G and Meyer TE**. 1988. *Nerve growth factor (NGF) is present in human placenta and semen, but undetectable in normal and Paget's disease blood: measurements with an anti-mouse-NGF enzyme immunoassay using a recombinant human NGF reference*. Biochemical and Biophysical Research Communications 155(1): 482-6.
- Herrera-Luna CV**, Budik S and Aurich C. 2012. *Gene expression of ACTH, glucocorticoid receptors, 11betaHSD enzymes, LH-, FSH-, GH receptors and aromatase in equine epididymal and testicular tissue*. Reproduction in Domestic Animals 47(6): 928-935.
- Hesser MW**, Morris JC and Gibbons JR. 2011. *Advances in recombinant gonadotropin production for use in bovine superovulation*. Reproduction in Domestic Animals 46(5): 933-942.

Hu GL and Neet KE. 1988. *Expression of the cDNA for mouse beta-nerve growth factor protein in Escherichia coli.* Gene 70(1): 57-65.

Ibáñez CF, Ebendal T, Barbany G, Murray-Rust J, Blundell TL and Persson H. 1992. *Disruption of the low affinity receptor-binding site in NGF allows neuronal survival and differentiation by binding to the trk gene product.* Cell 69(2): 329-341.

Ibáñez CF, Ilag LL, Murray-Rust J and Persson H. 1993. *An extended surface of binding to Trk tyrosine kinase receptors in NGF and BDNF allows the engineering of a multifunctional pan-neurotrophin.* The European Molecular Biology Organization Journal 12(6): 2281-2293.

Indo Y. 2010. *Nerve growth factor, pain, itch and inflammation: lessons from congenital insensitivity to pain with anhidrosis.* Expert Review of Neurotherapeutics 10(11): 1707-1724.

Iwane M, Kitamura Y, Kaisho Y, Yoshimura K, Shintani A, Sasada R, Nakagawa S, Kawahara K, Nakahama K and Kakinuma A. 1990. *Production, purification and characterization of biologically active recombinant human nerve growth factor.* Biochemical and Biophysical Research Communications 171(1): 116-122.

Jana B, Koszykowska M and Czarzasta J. 2011. *Expression of nerve growth factor and its receptors, TrkA and p75, in porcine ovaries.* The Journal of Reproduction and Development 57(4): 468-474.

Jin W, Arai KY, Shimizu K, Kojima C, Itoh M, Watanabe G and Taya K. 2006. *Cellular localization of NGF and its receptors trkA and p75LNGFR in male reproductive organs of the Japanese monkey, Macaca fuscata fuscata.* Endocrine 29(1): 155-160.

Jin W, Tanaka A, Watanabe G, Matsuda H and Taya K. 2010. *Effect of NGF on the motility and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa in vitro.* The Journal of Reproduction and Development 56(4): 437-443.

Jones KR and Reichardt LF. 1990. *Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87(20): 8060-8064.

Kahle P, Burton LE, Schmelzer CH and Hertel C. 1992. *The amino terminus of nerve growth factor is involved in the interaction with the receptor tyrosine kinase p140trkA*. The Journal of Biological Chemistry 267(32): 22707-22710.

Kakihana M, Kato K, Fukumoto H, Fujiwara E, Iwane M and Suno M. 1993. *Detailed characterization of the biological activities of recombinant human nerve growth factor expressed in Chinese hamster ovary cells*. Molecular and Chemical Neuropathology 18(1-2): 51-83.

Katzir I, Shani J, Goshen G, Sela J, Ninary E, Dogonovski AM, Shabashov D, Inoue S, Ikeda K, Hayashi K, Gorinstein S, Deutsch J and Lazarovici P. 2003. *Characterization of nerve growth factors (NGFs) from snake venoms by use of a novel, quantitative bioassay utilizing pheochromocytoma (PC12) cells overexpressing human trkA receptors*. Toxicon 42(5): 481-490.

Kershaw-Young CM, Druart X, Vaughan J and Maxwell WM. 2012. *beta-Nerve growth factor is a major component of alpaca seminal plasma and induces ovulation in female alpacas*. Reproduction, Fertility and Development 24(8): 1093-1097.

Kim JY, Kim YG and Lee GM. 2012. *CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential*. Applied Microbiology and Biotechnology 93(3): 917-30.

Kliemann M, Golbik R, Rudolph R, Schwarz E and Lilie H. 2007. *The pro-peptide of proNGF: structure formation and intramolecular association with NGF*. Protein science: a publication of the Protein Society 16(3): 411-419.

Koning WJD, Walsh GA, Wrynn AS and Headon DR. 1994. *Recombinant Reproduction*. Nature Biotechnology 12(10): 988-992.

Kumar S, Sharma VK, Singh S, Hariprasad GR, Mal G, Srinivasan A and Yadav S. 2013. *Proteomic identification of camel seminal plasma: purification of beta-nerve growth factor*. Animal Reproduction Science 136(4): 289-295.

Kuo WH and Chase HA. 2011. *Exploiting the interactions between poly-histidine fusion tags and immobilized metal ions*. Biotechnology Letters 33(6): 1075-1084.

Lai KO, Fu WY, Ip FC and Ip NY. 1998. *Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp*. Molecular and Cellular Neurosciences 11(1-2): 64-76.

- Lara HE**, Hill DF, Katz KH and Ojeda SR. 1990. *The gene encoding nerve growth factor is expressed in the immature rat ovary: effect of denervation and hormonal treatment*. Endocrinology 126(1): 357-363.
- Lebas F CP**, Rochambeau H, Thébault RG. 1997. *Reproducción*. En: El conejo. Cría y patología. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO): 51-68.
- Lee R**, Kermani P, Teng KK and Hempstead BL. 2001. *Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins*. Science 294(5548): 1945-8.
- Levanti MB**, Germana A, Abbate F, Montalbano G, Vega JA and Germana G. 2005. *TrkA and p75NTR in the ovary of adult cow and pig*. Journal of Anatomy 207(1): 93-96.
- Levanti MB**, Germana A, de Carlos F, Ciriaco E, Vega JA and Germana G. 2006. *Effects of increased nerve growth factor plasma levels on the expression of TrkA and p75 in rat testicles*. Journal of Anatomy 208(3): 373-379.
- Levi-Montalcini R and Cohen S**. 1960. *Effects of the extract of the mouse submaxillary salivary glands on the sympathetic system of mammals*. Annals of the New York Academy of Sciences 85: 324-341.
- Levi-Montalcini R**, Meyer H and Hamburger V. 1954. *In vitro experiments on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo*. Cancer Research 14(1): 49-57.
- Li B**, Sheng X, Song M, Zhang H, Weng J, Zhang M, Hu X, Zhou J, Xu M, Weng Q, Watanabe G and Taya K. 2012. *Expression of nerve growth factor and its receptors TrkA and p75 in the uterus of wild female ground squirrel (Citellus dauricus Brandt)*. General and Comparative Endocrinology 176(1): 62-69.
- Li B**, Sheng X, Bao L, Huang S, Li Q, Liu Y, Han Y, Watanabe G, Taya K and Weng Q. 2014. *Seasonal changes in expression of nerve growth factor and its receptors TrkA and p75 in the ovary of wild ground squirrel (Citellus dauricus Brandt)*. Journal of Ovarian Research 7: 3(1-9).
- Li C**, Watanabe G, Weng Q, Jin W, Furuta C, Suzuki AK, Kawaguchi M and Taya K. 2005. *Expression of nerve growth factor (NGF), and its receptors TrkA and p75 in the reproductive organs of the adult male rats*. Zoological science 22(8): 933-937.

- Li C**, Zheng L, Wang C and Zhou X. 2010a. *Absence of nerve growth factor and comparison of tyrosine kinase receptor A levels in mature spermatozoa from oligoasthenozoospermic, asthenozoospermic and fertile men*. Clinica Chimica Acta 411(19-20): 1482-1486.
- Li C**, Sun Y, Yi K, Ma Y, Sun Y, Zhang W and Zhou X. 2010b. *Detection of nerve growth factor (NGF) and its specific receptor (TrkA) in ejaculated bovine sperm, and the effects of NGF on sperm function*. Theriogenology 74(9): 1615-1622.
- Li C**, Ma Y, Yi K, Wang C, Li W, Liu Z, Sun L, Chen S, Yu J, Li H, Chen L and Zhou X. 2014. *The interactions between nerve growth factor and gonadotrophins in bovine oviduct*. Animal of Reproduction Science 149(3-4):117-123.
- Li J**, Xue B, Yuan Y, Ma M, Zhu L, Milburn R, Le L, Hu P and Ye J. 2015. *Construction of recombinant human nerve growth factor (rh-beta-NGF) eukaryotic vector and its expression in HEK293 cells*. Chinese Journal of Biotechnology 31(3): 411-420.
- Lin K**, Ding XF, Shi CG, Zeng D, QuZong S, Liu SH, Wu Y, LuoBu G, Fan M and Zhao YQ. 2015. *Nerve growth factor promotes human sperm motility in vitro by increasing the movement distance and the number of A grade spermatozoa*. Andrologia 47(9): 1041-1046.
- Livak KJ and Schmittgen TD**. 2001. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Methods: a companion to Methods in enzymology* 25(4): 402-408.
- Lobos E**, Gebhardt C, Kluge A and Spanel-Borowski K. 2005. *Expression of nerve growth factor (NGF) isoforms in the rat uterus during pregnancy: accumulation of precursor proNGF*. Endocrinology 146(4): 1922-1929.
- Lonnerberg P**, Soder O, Parvinen M, Ritzen EM and Persson H. 1992. *Beta-nerve growth factor influences the expression of androgen-binding protein messenger ribonucleic acid in the rat testis*. Biology of Reproduction 47(3): 381-388.
- Lorigados-Pedre L and Bergado-Rosado JA**. 2004. *El factor de crecimiento nervioso en la neurodegeneración y el tratamiento neurorestaurador*. Revista de neurologia 38(10): 957-971.

- Ma W**, Wang C, Su Y, Tian Y and Zhu H. 2015. *Expression of nerve growth factor and its receptor, tyrosine kinase receptor A, in rooster testes*. *Animal Reproduction Science* 161: 40-46.
- MacGrogan D**, Despres G, Romand R and Dicou E. 1991. *Expression of the beta-nerve growth factor gene in male sex organs of the mouse, rat, and guinea pig*. *Journal of Neuroscience Research* 28(4): 567-573.
- Maranesi M**, Zerani M, Leonardi L, Pistilli A, Arruda-Alencar J, Stabile A, Rende M, Castellini C, Petrucci L and Parillo F. 2015. *Gene expression and localization of NGF and its cognate receptors NTRK1 and NGFR in the sex organs of male rabbits*. *Reproduction in Domestic Animals* 50(6): 918-925.
- Maranesi M**, Parillo F, Leonardi L, Rebollar PG, Alonso B, Petrucci L, Gobbetti A, Boiti C, Arruda-Alencar J, Moura A and Zerani M. 2016. *Expression of nerve growth factor and its receptors in the uterus of rabbits: functional involvement in prostaglandin synthesis*. *Domestic Animal Endocrinology* 56: 20-28.
- Maranesi M**, Petrucci L, Leonardi L, Piro F, Rebollar PG, Millan P, Cocci P, Vullo C, Parillo F, Moura A, Mariscal GG, Boiti C and Zerani M. 2018. *New insights on a NGF-mediated pathway to induce ovulation in rabbits (Oryctolagus cuniculus)*. *Biology of Reproduction* 98(5): 634-643.
- Mari YM**, Espinosa AE, Ubieta R, Batista OF and Fernandez ML. 1999. *Effect of the selection marker on the viability and plasmid stability of two human proteins with neurotrophic action expressed in Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 258(1): 29-31.
- Maruccio L**, Lucini C, de Girolamo P, Avallone L, Solcan C, Nechita LE and Castaldo L. 2018. *Neurotrophins and Trk receptors in the developing and adult ovary of Coturnix coturnix japonica*. *Annals of Anatomy* 219: 35-43.
- Miller JB and Toft DO**. 1983. *Characterization and physiological variation of estrogen receptors in rabbit corpora lutea throughout pregnancy and pseudopregnancy: the effect of hysterectomy and sustained estradiol treatment*. *Biology of Reproduction* 29(3): 620-9.

- Minnone G**, De Benedetti F and Bracci-Laudiero L. 2017. *NGF and Its Receptors in the Regulation of Inflammatory Response*. International Journal of Molecular Sciences 18(5): 1028(1-20).
- Muller D**, Davidoff MS, Bargheer O, Paust HJ, Pusch W, Koeva Y, Jezek D, Holstein AF and Middendorff R. 2006. *The expression of neurotrophins and their receptors in the prenatal and adult human testis: evidence for functions in Leydig cells*. Histochemistry and Cell Biology 126(2): 199-211.
- Murphy BD**, Mapletoft RJ, Manns J and Humphrey WD. 1984. *Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response*. Theriogenology 21: 117-125.
- Naicy T**, Venkatachalapathy RT, Aravindakshan TV, Radhika G, Raghavan KC, Mini M and Shyama K. 2016. *Nerve Growth Factor gene ovarian expression, polymorphism identification, and association with litter size in goats*. Theriogenology 86(9): 2172-2178.e3.
- Nilsson AS**, Fainzilber M, Falck P and Ibanez CF. 1998. *Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish*. Federation of European Biochemical Societies Letters 424(3): 285-290.
- O'Leary S**, Jasper MJ, Robertson SA and Armstrong DT. 2006. *Seminal plasma regulates ovarian progesterone production, leukocyte recruitment and follicular cell responses in the pig*. Reproduction 132(1): 147-58.
- Oliveira C and Domingues L**. 2018. *Guidelines to reach high-quality purified recombinant proteins*. Applied Microbiology and Biotechnology 102(1): 81-92.
- Otten U**, Ehrhard P and Peck R. 1989. *Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 86(24): 10059-10063.
- Paoletti F**, de Chiara C, Kelly G, Covaceuszach S, Malerba F, Yan R, Lamba D, Cattaneo A and Pastore A. 2016. *Conformational Rigidity within Plasticity Promotes Differential Target Recognition of Nerve Growth Factor*. Frontiers in molecular biosciences 3(83): 1-10.

Parthipan S, Selvaraju S, Somashekar L, Arangasamy A, Sivaram M and Ravindra JP. 2017. *Spermatozoal transcripts expression levels are predictive of semen quality and conception rate in bulls (Bos taurus)*. Theriogenology 98: 41-49.

Parvinen M, Pelto-Huikko M, Soder O, Schultz R, Kaipia A, Mali P, Toppari J, Hakovirta H, Lonnerberg P, Ritzen EM, Ebendal T, Olson L, Hökfelt T and Persson H. 1992. *Expression of beta-nerve growth factor and its receptor in rat seminiferous epithelium: specific function at the onset of meiosis*. The Journal of Cell Biology 117(3): 629-641.

Pei Y. 2010. *Effect of nerve growth factor (NGF) on the development of preimplantation rabbit embryos in vitro*. Veterinary Research Communicatoin 34(1): 11-8.

Perrard MH, Vigier M, Damestoy A, Chapat C, Silandre D, Rudkin BB and Durand P. 2007. *beta-Nerve growth factor participates in an auto/paracrine pathway of regulation of the meiotic differentiation of rat spermatocytes*. Journal of Cell Physiology 210(1): 51-62.

Persson H, Ayer-Le Lievre C, Soder O, Villar MJ, Metsis M, Olson L, Ritzen M and Hokfelt T. 1990. *Expression of beta-nerve growth factor receptor mRNA in Sertoli cells downregulated by testosterone*. Science 247(4943): 704-707.

Pincelli C and Marconi A. 2000. *Autocrine nerve growth factor in human keratinocytes*. Journal of Dermatological Science 22(2): 71-79.

Pincelli C and Yaar M. 1997. *Nerve growth factor: its significance in cutaneous biology*. The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings 2(1): 31-6.

Quintela LA, Pena AI, Vega MD, Gullon J, Prieto MC, Barrio M, Becerra JJ, Maseda F and Herradon PG. 2004. *Ovulation induction in rabbit does submitted to artificial insemination by adding buserelin to the seminal dose*. Reproduction, Nutrition, Development 44(1): 79-88.

Rattenholl A, Ruoppolo M, Flagiello A, Monti M, Vinci F, Marino G, Lilie H, Schwarz E and Rudolph R. 2001. *Pro-sequence assisted folding and disulfide bond formation of human nerve growth factor*. Journal of Molecular Biology 305(3): 523-33.

- Ratto MH**, Huanca W, Singh J and Adams GP. 2005. *Local versus systemic effect of ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas*. Reproductive Biology and Endocrinology 3: 29.
- Ratto MH**, Leduc YA, Valderrama XP, van Straaten KE, Delbaere LT, Pierson RA and Adams GP. 2012. *The nerve of ovulation-inducing factor in semen*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109(37): 15042-15047.
- Rebollar PG**, Dal Bosco A, Millán P, Cardinali R, Brecchia G, Sylla L, Lorenzo PL and Castellini C. 2012. *Ovulating induction methods in rabbit does: the pituitary and ovarian responses*. Theriogenology 77(2):292-298.
- Rebollar PG**. 2017. *Fisiología de la reproducción en el macho*. En: Biotecnologías de la reproducción aplicadas a especies de interés veterinario. Monografías INIA: Serie ganadera 5: 43-51.
- Rodriguez-Martinez H**, Kvist U, Ernerudh J, Sanz L and Calvete JJ. 2011. *Seminal plasma proteins: what role do they play?* American Journal of Reproductive Immunology 66(Suppl 1): 11-22.
- Romero C**, Paredes A, Dissen GA and Ojeda SR. 2002. *Nerve growth factor induces the expression of functional FSH receptors in newly formed follicles of the rat ovary*. Endocrinology 143(4): 1485-1494.
- Russo MA**, Giustizieri ML, Favale A, Fantini MC, Campagnolo L, Konda D, Germano F, Farini D, Manna C and Siracusa G. 1999. *Spatiotemporal patterns of expression of neurotrophins and neurotrophin receptors in mice suggest functional roles in testicular and epididymal morphogenesis*. Biology of Reproduction 61(4): 1123-32.
- Russo MA**, Odorisio T, Fradeani A, Rienzi L, De Felici M, Cattaneo A and Siracusa G. 1994. *Low-affinity nerve growth factor receptor is expressed during testicular morphogenesis and in germ cells at specific stages of spermatogenesis*. Molecular Reproduction and Development 37(2): 157-166.
- Rydén M**, Hempstead B and Ibáñez CF. 1997. *Differential modulation of neuron survival during development by nerve growth factor binding to the p75 neurotrophin receptor*. The Journal of Biological Chemistry 272(26): 16322-16328.

Saeednia S, Bahadoran H, Amidi F, Asadi MH, Naji M, Fallahi P and Nejad NA. 2015. *Nerve growth factor in human semen: Effect of nerve growth factor on the normozoospermic men during cryopreservation process*. Iranian Journal of Basic Medical Sciences 18(3): 292-9.

Saeednia S, Shabani Nashtaei M, Bahadoran H, Aleyasin A and Amidi F. 2016. *Effect of nerve growth factor on sperm quality in asthenozoospermic men during cryopreservation*. Reproductive Biology and Endocrinology 14(1): 29(1-8).

Salas C, Julio-Pieper M, Valladares M, Pommer R, Vega M, Mastronardi C, Kerr B, Ojeda SR, Lara HE and Romero C. 2016. *Nerve growth factor-dependent activation of trkA receptors in the human ovary results in synthesis of follicle-stimulating hormone receptors and estrogen secretion*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 91(6):2396-2403.

Sanchez-Rodriguez A, Lorenzo PL and Rebollar PG. 2015. *Producción y calidad espermática del eyaculado de conejo según el ritmo de recogida*. Boletín de Cunicultura 178: 18-22.

Satoh F, Mimata H, Nomura T, Fujita Y, Shin T, Sakamoto S, Hamada Y and Nomura Y. 2001. *Autocrine expression of neurotrophins and their receptors in prostate cancer*. International Journal of Urology 8(7): S28-34.

Sechi S. 2002. *A method to identify and simultaneously determine the relative quantities of proteins isolated by gel electrophoresis*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 16:1416–1424.

Seidl K and Holstein AF. 1990. *Evidence for the presence of nerve growth factor (NGF) and NGF receptors in human testis*. Cell and Tissue Research 261(3): 549-54.

Shi C-G, Lin K, Xu X-B, Zhang S-C, Wang N and Fan M. 2012. *Evidence for the involvement of NGF in human sperm motility*. Journal of Biomedical Science and Engineering 5:534-541.

Shih A, Laramée GR, Schmelzer CH, Burton LE and Winslow JW. 1994. *Mutagenesis identifies amino-terminal residues of nerve growth factor necessary for Trk receptor binding and biological activity*. The Journal of Biological Chemistry 269(44): 27679-27686.

Shikata H, Utsumi N, Hiramatsu M, Minami N, Nemoto N and Shikata T. 1984. *Immunohistochemical localization of nerve growth factor and epidermal growth factor in guinea pig prostate gland*. Histochemistry 80(4): 411-413.

Shooter EM. 2001. *Early Days of the Nerve Growth Factor Proteins*. Annual Review of Neuroscience 24: 601-629.

Silva M, Nino A, Guerra M, Letelier C, Valderrama XP, Adams GP and Ratto MH. 2011a. *Is an ovulation-inducing factor (OIF) present in the seminal plasma of rabbits?* Animal Reproduction Science 127(3-4): 213-21.

Silva ME, Smulders JP, Guerra M, Valderrama XP, Letelier C, Adams GP and Ratto MH. 2011b. *Cetrorelix suppresses the preovulatory LH surge and ovulation induced by ovulation-inducing factor (OIF) present in llama seminal plasma*. Reproductive Biology and Endocrinology 9: 74(1-9).

Silva M, Ulloa-Leal C, Norambuena C, Fernandez A, Adams GP and Ratto MH. 2014. *Ovulation-inducing factor (OIF/NGF) from seminal plasma origin enhances Corpus Luteum function in llamas regardless the preovulatory follicle diameter*. Animal Reproduction Science 148(3-4): 221-227.

Silva M, Fernández A, Ulloa-Leal C, Adams GP, Berland MA and Ratto MH. 2015. *LH release and ovulatory response after intramuscular, intravenous, and intrauterine administration of β -nerve growth factor of seminal plasma origin in female llamas*. Theriogenology 84(7): 1096-1102.

Silva M, Ulloa-Leal C, Valderrama XP, Bogle OA, Adams GP and Ratto MH. 2017a. *Nerve growth factor from seminal plasma origin (spbeta-NGF) increases CL vascularization and level of mRNA expression of steroidogenic enzymes during the early stage of Corpus Luteum development in llamas*. Theriogenology 103: 69-75.

Silva M, Urrea F, Ulloa-Leal C and Ratto MH. 2017b. *A comparative study of the effects of intramuscular administration of gonadorelin, mating and intrauterine infusion of either raw seminal plasma or seminal plasma purified beta-NGF on luteal development in llamas*. Reproduction in Domestic Animals 52(4): 625-631.

Simmons LW and Fitzpatrick JL. 2012. *Sperm wars and the evolution of male fertility*. Reproduction 144(5): 519-534.

- Sofroniew MV**, Howe CL and Mobley WC. 2001. *Nerve Growth Factor Signaling, Neuroprotection, and Neural Repair*. Annual Review of Neuroscience 24: 1217-1281.
- Song EJ and Yoo YS**. 2011. *Nerve growth factor-induced neurite outgrowth is potentiated by stabilization of TrkA receptors*. BMB Reports 44(3): 182-186.
- Song M and Chen SZ**. 2003. *Construction of the eukaryotic expression vector of mouse beta-NGF and its expression in NIH 3T3 fibroblast cell lines*. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi 19(2): 124-126.
- Squillaciotti C**, De Luca A, Paino S, Langella E and Mirabella N. 2009. *Effects of castration on the expression of the NGF and TrkA in the vas deferens and accessory male genital glands of the rat*. European Journal of Histochemistry 53(4): 239-248.
- Stewart JL**, Mercadante VRG, Dias NW, Canisso IF, Yau P, Imai B and Lima FS. 2018. *Nerve Growth Factor-Beta, purified from bull seminal plasma, enhances corpus luteum formation and conceptus development in Bos taurus cows*. Theriogenology 106: 30-38.
- Stuart CC**, Vaughan JL, Kershaw-Young CM, Wilkinson J, Bathgate R and de Graaf SP. 2015. *Effects of varying doses of beta-nerve growth factor on the timing of ovulation, plasma progesterone concentration and corpus luteum size in female alpacas (Vicugna pacos)*. Reproduction Fertility and Development 27(8): 1181-1186.
- Sullivan R and Mieuisset R**. 2016. *The human epididymis: its function in sperm maturation*. Human Reproduction Update 22(5): 574-587.
- Tanco VM**, Ratto MH, Lazzarotto M and Adams GP. 2011. *Dose-Response of Female Llamas to Ovulation-Inducing Factor from Seminal Plasma*. Biology of Reproduction 85(3): 452-456.
- Tanco VM**, Van Steelandt MD, Ratto MH and Adams GP. 2012. *Effect of purified llama ovulation-inducing factor (OIF) on ovarian function in cattle*. Theriogenology 78(5): 1030-1039.
- Thomas P and Smart TG**. 2005. *HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins*. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 51(3): 187-200.
- Timón P**. 2018. *Evolución de parámetros relacionados con la Producción, la calidad seminal y la fertilidad de conejos híbridos (Neozelandés blanco x Californiano) durante*

la maduración sexual. Trabajo Fin de Máster. Máster en Producción y Sanidad Animal. UCM-UPM

Tometten M, Blois S and Arck PC. 2005. *Nerve growth factor in reproductive biology: link between the immune, endocrine and nervous system?* Chemical Immunology and Allergy 89: 135-48.

Tribulo P, Bogle O, Mapletoft RJ and Adams GP. 2015. *Bioactivity of ovulation inducing factor (or nerve growth factor) in bovine seminal plasma and its effects on ovarian function in cattle*. Theriogenology 83(9): 1394-1401.

Ulloa-Leal C, Bogle OA, Adams GP and Ratto MH. 2014. *Luteotrophic effect of ovulation-inducing factor/nerve growth factor present in the seminal plasma of llamas*. Theriogenology 81(8): 1101-1107.

Ultsch MH, Wiesmann C, Simmons LC, Henrich J, Yang M, Reilly D, Bass SH and de Vos AM. 1999. *Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC*. Journal of Molecular Biology 290(1): 149-159.

Varol FG, Duchemin AM, Neff NH and Hadjiconstantinou M. 2000. *Nerve growth factor (NGF) and NGF mRNA change in rat uterus during pregnancy*. Neuroscience Letters 294(1): 58-62.

Verze P, Cai T and Lorenzetti S. 2016. *The role of the prostate in male fertility, health and disease*. Nature Reviews Urology 13(7): 379-86.

Vieira Gomes AM, Souza Carmo T, Silva Carvalho L, Mendonca Bahia F and Parachin NS. 2018. *Comparison of Yeasts as Hosts for Recombinant Protein Production*. Microorganisms 6(2): 38(1-23).

Vigentini I, Merico A, Tutino ML, Compagno C and Marino G. 2006. *Optimization of recombinant human nerve growth factor production in the psychrophilic Pseudoalteromonas haloplanktis*. Journal of Biotechnology 127(1): 141-50.

Viudes-de-Castro MP, Lavara R, Marco-Jiménez F, Cortell C and Vicente JS. 2007. *Ovulation induced by mucosa vaginal absorption of buserelin and triptorelin in rabbit*. Theriogenology 68(7):1031-1036.

- Viudes-de-Castro MP**, Casares-Crespo L, Monserrat-Martínez A and Vicente JS. 2015. *Determination of enzyme activity in rabbit seminal plasma and its relationship with quality semen parameters*. World Rabbit Science 23(4): 247-253.
- Wang H**, Dong Y, Chen W, Hei J and Dong C. 2011. *Expression and localization of nerve growth factor (NGF) in the testis of alpaca (llama pacos)*. Folia Histochemica et Cytobiologica 49(1): 55-61.
- Wehrman T**, He X, Raab B, Dukipatti A, Blau H and Garcia KC. 2007. *Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors*. Neuron 53(1): 25-38.
- Weng Q**, Shi Z, Kawaguchi M, Watanabe G and Taya K. 2008. *Expression of nerve growth factor and its receptors trkA and p75 and inhibin alpha-subunit in the ovarian interstitial cells of lactating golden hamsters*. The Journal of Reproduction and Development 54(5): 397-401.
- Wiesmann C and de Vos AM**. 2001. *Nerve growth factor: structure and function*. Cellular and Molecular Life Sciences 58(5-6): 748-759.
- Wrobel KH**, Bickel D, Schimmel M and Kujat R. 1996. *Immunohistochemical demonstration of nerve growth factor receptor in bovine testis*. Cell and Tissue Research 285(2): 189-197.
- Xu L**, Li Y, Shi X, Han C, Tao L, Yang Q and Rao C. 2014. *Expression, purification, and characterization of recombinant mouse nerve growth factor in Chinese hamster ovary cells*. Protein Expression and Purification 104: 41-49.
- Zhang H**, Wang Y, Zhang J, Wang L, Li Q, Sheng X, Han Y, Yuan Z and Weng Q. 2015. *Testicular expression of NGF, TrkA and p75 during seasonal spermatogenesis of the wild ground squirrel (Citellus dauricus Brandt)*. European Journal of Histochemistry 59(3): 198-204.
- Zhang J**, Zhang L, Zhang X, Chai J and Li C. 1997. *The high expression of human beta-nerve growth factor in E. coli*. Wei Sheng Wu Xue Bao 37(6): 429-433.
- Zhou Y**, Lu Z, Wang X, Selvaraj JN and Zhang G. 2018. *Genetic engineering modification and fermentation optimization for extracellular production of recombinant*

proteins using Escherichia coli. Applied Microbiology and Biotechnology 102(4): 1545-1556.

Zhu YY, Machleder EM, Chenchik A, Li R and Siebert PD.2001. *Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. Biotechniques* 30(4): 892-897.

ANEXOS

Anexo I.

SECUENCIA GENÉTICA DE NGF DE PRÓSTATA DE CONEJO

En marrón clarito se marca la secuencia genética de la cadena beta de NGF y en marrón oscuro su secuencia proteica.

ATG TCC ATG TTG TTC TAC ACT CTG ATC ACA GCG TTA CTG ATT GGC ATA CAG GCG GAA CCA CAT GCA GAC AGC AAT GTC CCA GCA GGA CAC GCC CTG CCC C < 100
M S M L F Y T L I T A L L I G I Q A E P H A D S N V P A G H A L P Q

AA GCC CAC TGG ACT AAA CTG CAG CAT TCC CTG GAC ACA GCC CTC CGC AGA GCC CGC GCA GCC CCT GCC GTG GCC ATA GCT GCA CGG GTG GCC GGG CAG AC < 200
A H W T K L Q H S L D T A L R R A R A A P A V A I A A R V A G Q T

C CGC AAC ATC ACC GTG GAC CCC AGA CTT TTT AAG AAA CGA CGC CTG CGG TCC CCC CGG GTG CTG TTC AGC ACG CAG CCC CCG CTG GCC GCT GTG GAC TTT < 300
R N I T V D P R L F K K R R L R S P R V L F S T Q P P L A A V D F

GAG GAG CTG GAC CTG GAG GTG GAC GTG GGC TCC CCC TCC AAC AGG ACT TAC AGG AGC AAG CGC TCG GCC CCC CAC CCC GTC TTC CAC ATG GGA GAG TTC T < 400
E E L D L E V D V G S P S N R T Y R S K R S A P H P V F H M G E F S

CG GTG TGC GAC AGC GTC AGC GTG TGG GTT GGG GAC AAG ACC ACC GCC ACG GAC ATC AAG GGC AAT GAG GTG AAG GTA CTG GGG GAG GTG AAC ATT AAC AA < 500
V C D S V S V W V G D K T T A T D I K G N E V K V L G E V N I N N

C AGC GTG TTC AAA CAG TAC TTT TTC GAG ACC AAG TGC CGA GAC CCC AAT CCC GTG GAG AGC GGG TGC CGC GGC ATT GAC GCA AAG CAC TGG AAC TCG TAC < 600
S V F K Q Y F F E T K C R D P N P V E S G C R G I D A K H W N S Y

TGC ACC ACG ACT CAC ACG TTC GTC AAG GCG CTG ACC ACG GAC GAC AAG CAG GCC GCC TGG CGC TTC ATC CGC ATC GAC ACA GCC TGC GTG TGC GTG CTC A < 700
C T T T H T F V K A L T T D D K Q A A W R F I R I D T A C V C V L S

GC AGG AAG GCT TCC CGG AGG GGC < 723
R K A S R R G

Anexo II.

SECUENCIA DE NGF DE PRÓSTATA DE CONEJO PUBLICADA EN LA BASE DE DATOS GENBANK (NCBI)

Oryctolagus cuniculus breed New Zealand x California nerve growth factor (NGF) mRNA, complete cds

GenBank: KX528686.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#) ☐

LOCUS KX528686 1016 bp mRNA linear MAM 31-AUG-2018
DEFINITION Oryctolagus cuniculus breed New Zealand x California nerve growth factor (NGF) mRNA, complete cds.
ACCESSION KX528686
VERSION KX528686.1
KEYWORDS .
SOURCE Oryctolagus cuniculus (rabbit)
ORGANISM [Oryctolagus cuniculus](#)
cellular organisms; Eukaryota; Opisthokonta; Metazoa; Eumetazoa; Bilateria; Deuterostomia; Chordata; Craniata; Vertebrata; Gnathostomata; Teleostomi; Euteleostomi; Sarcopterygii; Dipnotetrapodomorpha; Tetrapoda; Amniota; Mammalia; Theria; Eutheria; Boreoeutheria; Euarchontoglires; Glires; Lagomorpha; Leporidae; Oryctolagus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1016)
AUTHORS Sanchez-Rodriguez,A., Abad,P., Rebollar,P.G., Arias-Alvarez,M., Lorenzo,P.L., Garcia-Garcia,R.M. and Bautista,J.M.
TITLE Expression and purification of rabbit nerve growth factor in CHO cells
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1016)
AUTHORS Sanchez-Rodriguez,A., Abad,P., Rebollar,P.G., Arias-Alvarez,M., Lorenzo,P.L., Garcia-Garcia,R.M. and Bautista,J.M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (11-JUL-2016) Physiology (Animal Physiology), Universidad Complutense de Madrid (UCM)-Facultad Veterinaria, Avda Puerta de Hierro s/n, Madrid, Madrid 28040, Espana
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..1016
/organism="Oryctolagus cuniculus"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:9986"
/sex="male"
/tissue_type="Prostate"
/note="breed: New Zealand x California"
[gene](#) 1..1016
/gene="NGF"
[CDS](#) 137..862
/gene="NGF"
/codon_start=1
/product="nerve growth factor"
/protein_id="ASR92152.1"
/translation="MSMLFYTLITALLIGIQAEPHADSNVPAGHALPQAHHTKLQHS
LDTALRRARAAPAVAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRLRSPRVLFSTQPPLAADVFE
LDELDVVGSPSNRTYRSKRSAHPVFMHGEFSVCDSSVIAVGDKTTATDIKGNEVKVL
GEVNIINNSVFKQYFFETKCRDPNPVESGCRGIDAKHNSYCTTHTFVKALTTDDKQA
AWRFIRIDTACVCLSRKASRRG"
ORIGIN
1 agttctggcc tgtgatcgtg cagtccaggg ggctggatgg catgctggac ccaagctcag
61 ctacagcgtcc gggcccaata acggcttttc caaggagagca gctttctgtc ctggccacgc
121 tgaggtgcat agcgtaatgt ccatgttgtt ctacactctg atcacagcgt tactgattgg
181 catacaggcg gaaccacatg cagacagcaa tgtccagca ggacacgccc tgccccaagc
241 ccactggact aaactgcagc attccctgga cacagccctc cgcagagccc gcgcagcccc
301 tgccgtggcc atagctgcac gggtggccgg gcagaccgac aacatcaccc tggacccccag
361 actttttaag aaacgacgcc tgcggtcccc ccgggtgctg ttcagcacgc agccccgct
421 ggccgctgtg gactttgagg agctggacct ggaggtggac gtgggctccc cctccaacag
481 gacttacagg agcaagcgct cggcccccca cccgctcttc cacatgggag agttctcggt
541 gtgcgacagc gtcagcgtgt gggttgggga caagaccacc gccacggaca tcaagggcaa
601 tgaggtgaag gtactggggg aggtgaacat taacaacagc gtgttcaaac agtacttttt
661 cgagaccaaag tgccgagacc ccaatccggt ggagagcggg tgccgcgcca ttgacgcaaa
721 gcactggaac tcgtactgca ccacgactca cacgttcgtc aaggcgctga ccacggacga
781 caagcaggcc gcttggcgct tcatccgcat cgacacagcc tgcgtgtgcg tgctcagcag
841 gaaggcttcc cggaggggct gagctgcccg cggccccctc ccccgcccc ccacactctc
901 ctgggcccctc tccctacctc aacctgtaaa ttattttaaa ttataaggac tgcattgtaa
961 tttatagttt atacagtttt aaaaaagaat cattatttat taaatttttg aagcat

Anexo III.

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS RELACIONADAS

Publicaciones

Sánchez-Rodríguez A, García-García RM, AriasÁlvarez M, Lorenzo PL, Rebollar PG. Nuevas perspectivas para la inducción de la ovulación y empleo de semen congelado. 2015. Boletín de Cunicultura 176: 34-37.

Sánchez-Rodríguez A, Lorenzo PL, Rebollar PG. Producción y calidad espermática del eyaculado de conejo según el ritmo de recogida. 2015. Boletín de Cunicultura 178: 18-22.

Garcia-Garcia RM, Masdeu MM, **Sanchez-Rodriguez A**, Millan P, Arias-Alvarez M, Sakr OG, Bautista JM, Castellini C, Lorenzo PL, Rebollar PG. 2018. β -nerve growth factor identification in male rabbit genital tract and seminal plasma and its role in ovulation induction in rabbit does. Italian Journal of Animal Science 432 17(2): 442-453.

Sanchez-Rodriguez A, Arias-Alvarez M, Rebollar PG, Bautista JM, Lorenzo PL, Garcia-Garcia RM. 2018. Gene expression and immunolocalization of low-affinity neurotrophin receptor (p75) in rabbit male reproductive tract during sexual maturation. Reproduction in Domestic Animals. *In press*. <https://doi.org/10.1111/rda.13257> .

Congresos internacionales

Garcia-Garcia RM, Masdeu M, **Sánchez-Rodríguez A**, Bautista JM, Arias-Alvarez M, Lorenzo PL, Rebollar PG

Expression of β -nerve growth factor in rabbit male tract and seminal plasma. Póster.

Animal Reproduction 2015, 12 (3): 562

31st Scientific Meeting AETE (Asociación Europea de Transferencia Embrionaria)

Gante (Bélgica), 11-12 Septiembre 2015

Cañón-Beltrán K, Cajas Y, **Sanchez-Rodríguez A**, Bautista JM, Carrera R, Lorenzo PL, Garcia-Garcia RM, Arias-Alvarez M

mRNA expression and immunolocalization of Insuline-like Growth Factor-I (IGF-I) and its receptor (IGF-IR) in the guinea pig ovary. Póster.

18th International Congress of Animal Reproduction (ICAR)

Nouzilly (Francia), 26-30 Junio 2016

Sanchez-Rodríguez A, Lorenzo PL, Arias-Alvarez M, Rebollar PG, Garcia-Garcia RM

Immunolocalization of nerve growth factor high-affinity receptor (TrkA) in rabbit male tract.

Poster

Reproduction in Domestic Animal 2017, 52 (Suppl. 4):97-98

14th International Conference of AERA (Asociación Española de Reproducción Animal)

Barcelona (España), 9-11 Noviembre 2017

Sanchez-Rodríguez A, Arias-Alvarez M, Rebollar PG, Lorenzo PL, Garcia-Garcia RM

Immunolocalization of β -NGF in male reproductive tract and NGF levels in serum and seminal plasma at puberty and adulthood in rabbit. Poster

Reproduction, Fertility and Development 30, 214-214.

44th IETS Annual Conference (Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria)

Bangkok (Tailandia), 13-16 Enero 2018

Sanchez-Rodríguez A, Arias-Alvarez M, Rebollar PG, Bautista JM, Lorenzo PL, Garcia-Garcia RM

Gene expression and immunolocalization of β -NGF low-affinity receptor (p75) in rabbit male reproductive tract. Comunicación oral

22nd Annual Conference of ESDAR (Sociedad Europea de Reproducción en Animales Domésticos)

Córdoba (España), 27-29 Septiembre 2018

Arias-Álvarez M, Garcia-Garcia RM, Jiménez-Martínez MA, Rodríguez M, **Sanchez-Rodríguez A**, Lorenzo PL, Rebollar PG

Maternal nutritional restriction modulates placental VEGF. Immunolocalization and fetoplacental development in the rabbit. Póster

22nd Annual Conference of ESDAR (Sociedad Europea de Reproducción en Animales Domésticos)

Córdoba (España), 27-29 Septiembre 2018

Garcia-Garcia RM, Arias Alvarez M, **Sanchez-Rodríguez A**, Rebollar PG, Lorenzo PL
NGF system is differentially expressed in the ovary, oviduct and uterus of rabbit does although independent of serum hormonal levels. Comunicación oral

22nd Annual Conference of ESDAR (Sociedad Europea de Reproducción en Animales Domésticos)

Córdoba (España), 27-29 Septiembre 2018

Congresos nacionales

Sánchez-Rodríguez A, Masdeu M, García-García RM, Arias-Álvarez M, Lorenzo PL, Rebollar PG.

Descripción de los parámetros seminales del conejo ibicenco. Comunicación oral.

XVI Jornadas sobre Producción Animal (ITEA)

Zaragoza (España), 19-20 Mayo 2015.

Sánchez-Rodríguez A, García-García RM, Bautista JM, Lorenzo PL, Rebollar PG.

Expresión del Factor de Crecimiento Nervioso β (β -NGF) en el tracto reproductor masculino de conejo. Póster.

I Vetindoc: Jornada de Investigación en doctorado.

Madrid (España), 24 Junio 2015

Sánchez-Rodríguez A

Inseminación artificial en conejas y aplicación de técnicas necesarias para la inducción de la ovulación. Ponencia invitada.

I Jornadas sobre Medicina y Producción en Conejos

Madrid (España), 2 Junio 2016

Sanchez-Rodriguez A, Abad P, Da Silva KL, Arias-Alvarez M, Bautista JM, Rodriguez M, Lorenzo PL, Rebollar PG, García-García RM

Expresión del factor de crecimiento nervioso β (β -NGF) y su receptor de baja afinidad (p75) en el tracto reproductor masculino de conejo. Resultados preliminares. Comunicación oral.

II Vetindoc: Jornada en investigación de doctorado

Madrid (España), 23 Junio 2016

Sanchez-Rodriguez A, Masdeu M, Arias-Alvarez M, Lorenzo PL, Bautista JM, Rebollar PG, Garcia-Garcia RM

Identificación del b-NGF en el plasma seminal purificado de conejo y localización de su receptor de alta afinidad (TrkA) en el tracto reproductor masculino. Comunicación oral.

XVII Jornadas sobre Producción Animal (ITEA)

Zaragoza (España), 30-31 Mayo 2017.

Sánchez-Rodríguez A, García-García RM, Timón P, Varona J, Arias-Álvarez M,
Lorenzo PL, Rebollar PG

Efecto de la administración intramuscular del factor de crecimiento nervioso (NGF)
recombinante sobre la ovulación de las conejas. Comunicación oral

III Jornadas PhDay

Madrid (España), 27 Junio 2018

Anexo IV.

**ARTÍCULO CIENTÍFICO PUBLICADO RELACIONADO CON LA TESIS
DOCTORAL**

**Gene expression and immunolocalization of low-affinity neurotrophin receptor (p75)
in rabbit male reproductive tract during sexual maturation.**

Ana Sanchez-Rodriguez, Maria Arias-Alvarez, Pilar G. Rebollar, José M. Bautista, Pedro
L. Lorenzo, Rosa M. Garcia-Garcia

Publicado en *Reproduction in Domestic Animals*. *In press*

<https://doi.org/10.1111/rda.13257>

Factor de impacto: 1.422

Gene expression and immunolocalization of low-affinity neurotrophin receptor (p75) in rabbit male reproductive tract during sexual maturation

Ana Sanchez-Rodriguez¹ | Maria Arias-Alvarez² | Pilar G. Rebollar³ |
Jose M. Bautista⁴ | Pedro L. Lorenzo¹ | Rosa M. Garcia-Garcia¹

¹Department of Physiology, Veterinary Medicine Faculty, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

²Department of Animal Production, Veterinary Medicine Faculty, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

³Department of Agrarian Production, ETSIAAB, Polytechnic University of Madrid, Madrid, Spain

⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology, Veterinary Medicine Faculty, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

Correspondence

Rosa M. Garcia-Garcia, Department of Physiology, Veterinary Medicine Faculty, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain.
Email: rosa.garcia@vet.ucm.es

Funding information

AGL2015-65572-C2 Grant

Contents

This study reports the gene expression and immunolocalization of the low-affinity neurotrophin receptor, p75, in accessory glands (prostate and bulbourethral glands) and epididymis (caput and cauda) of male rabbits during sexual maturation. We showed that p75 was expressed in all tissues studied with similar mRNA levels during this period. However, it was differentially immunolocalized in bulbourethral glands and stereocilia of epididymis. These findings may be related with some remodeling processes in the accessory glands during sexual maturation, which could be associated with sperm maturation. The interaction of p75 with neurotrophins in rabbit male reproductive tract suggests the possible implication of this system in sexual maturation in rabbits.

KEYWORDS

gene expression, immunolocalization, neurotrophin receptor, p75, rabbit male, sexual maturity

1 | INTRODUCTION

Low-affinity receptor, p75 is a member of the death-promoting tumor necrosis factor family. It mediates the biological function of the neurotrophin beta Nerve Growth Factor (bNGF) and also is able to bind to others neurotrophins known (neurotrophins 3 and 4/5 and brain-derived neurotrophic factor, BDNF), mediating apoptotic and pro-survival signals in the nervous system (Wehrman et al., 2007).

The sexual maturation period is a crucial stage where some important changes occur in the reproductive tract, determining male long-term seminal quality and productivity of rabbit in the farm. We have demonstrated the expression and localization of the neurotrophin bNGF and its high-affinity receptor, TrkA, in rabbit male tract during this period (Sanchez-Rodriguez, Arias-Alvarez, Rebollar, Lorenzo, & Garcia-Garcia, 2018; Sanchez-Rodriguez, Lorenzo, Arias-Alvarez, Rebollar, & Garcia-Garcia, 2017). Thus, NGF/TrkA system

seems to be implicated in the sexual development of the male, but there are no studies about p75. Hence, in this study, we investigated the gene expression and immunolocalization of p75 in accessory glands (prostate and bulbourethral glands) and in epididymis (caput and cauda) of rabbit males at two time-points in the critical period of sexual maturation.

2 | MATERIAL AND METHODS

Eight New Zealand x California male rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) were reared on the experimental farm at the Agrarian Production Department (Polytechnic University Spain), in individual cages under ambient controlled conditions (16HL:8HD, 20–25°C of temperature and a relative humidity of 60%–75%) and with free access to food and water. All experimental procedures were approved by the Animal